



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

**HEIDI SAASTAMOINEN**  
**MIKROBIT POLTTOAINEEN VARASTOINNISSA**  
**JA JAKELUSSA**

Diplomityö

Tarkastaja: professori Jaakko Puhakka  
Tarkastaja ja aihe hyväksytty  
Luonnontieteiden ja ympäristötekniikan  
tiedekuntaneuvoston kokouksessa  
4. marraskuuta 2009

# TIIVISTELMÄ

TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Biotekniikan koulutusohjelma

**SAASTAMOINEN, HEIDI:** Mikrobit polttoaineen varastoinnissa ja jakelussa

Diplomityö, 97 sivua

Heinäkuu 2011

Pääaine: Ympäristöbiotekniikka

Ohjaaja: FT Kathryn Wakeman

Tarkastaja: professori Jaakko Puhakka

Avainsanat: polttoaine, varastointi, jakelu, mikrobi, mikrobikontaminaatio, mikrobidiversiteetti, mikrobikasvun hillintä

Polttoaineiden hiilivetyjen on tiedetty ylläpitävän mikrobien kasvua jo yli 70 vuoden ajan. Tämän diplomityön yhtenä tavoitteena oli tehdä kirjallisuuskatsaus erilaisten polttoaineiden mikrobiologisesta kontaminaatiosta. Kokeellisen osuuden tavoitteena oli tutkia polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi, mikrobien määrää ja diversiteettiä eri polttoaineissa, polttoaineiden pilaantumisen etenemistä sekä mikrobikasvun hillitsemistä ja estoa.

Diplomityön kokeellisessa osuudessa tutkittiin kahta polttoainetta. Polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi tutkittiin kolmella eri mikrobien kasvutavalla: kiinteällä kasvatusalustalla, liukoisessa vesifaasissa ravistelupullokokein sekä biofilmissä. Polttoainetta 1 ei voida käyttää sellaisenaan hiilenlähteenä kiinteässä kasvatusalustassa, sillä se ei absorboitunut alustaan. Ravistelupullokokeissa saatiin rikastettua polttoaineessa 1 esiintyviä mikro-organismeja ja molempien tutkittujen polttoaineiden havaittiin soveltuvan mikrobien ravinnoksi. Mineraalisuolaliuoksen havaittiin edistävän ja matalan pH:n rajoittavan mikrobikasvua polttoaineissa. Biofilmin mikrobikasvua havaittiin polttoaineen 1 varastosäiliöiden pinnoitemateriaalilla päällystetyissä mikroskoopin objektilaseissa sekä polttoaineen 1 että vesifaasien rajapinnoilla. Veden saatavuuden ja matalan pH:n havaittiin rajoittavan biofilmin muodostusta.

Lämpötilan vaikutusta mikrobikasvun kinetiikkaan polttoaineessa 1 tutkittiin ravistelupullokokein kolmessa lämpötilassa. Mikrobikasvun havaittiin olevan nopeinta 27°C lämpötilassa sekä tapahtuvan viiveellä ja hitaammin 37°C lämpötilassa. 6°C lämpötilassa ei havaittu mikrobikasvua tutkimusjakson aikana. Mikrobikasvun hillintää tutkittiin anaerobisissa olosuhteissa polttoaineessa 1. Mikrobikasvua ei havaittu tutkimusjakson aikana. Mikrobikasvua polttoaineessa voidaan hillitä veden määrää vähentämällä, matalalla pH:lla ja lämpötilalla sekä anaerobisilla olosuhteilla. Veden saatavuuden rajoitus polttoaineen varastosäiliössä on toteutettavissa säännöllisellä ja huolellisella vedenpoistolla. Anaerobisten olosuhteiden teknisen toteutuksen mahdollisuutta ja taloudellisuutta tulisi tutkia täydessä mittakaavassa todellisessa polttoaineen varastointiympäristössä.

Mikrobien lukumäärää polttoaineessa 1 tutkittiin standardin IP 385/99 mukaisen maljakasvatusmenetelmän ja mikroskopoinnin avulla. Sekä pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä (11 – 15 PMY/ml) että kokonaissolumäärä (453 – 1271 solua/ml) oli tutkituissa näytteissä hyvin pieni. Mikrobien diversiteettiä polttoaineessa 1 tutkittiin molekulaaristen menetelmien avulla. Näytteiden prokarioottidiversiteetti oli laaja, mutta eukarioottidiversiteetti oli pieni. Mikro-organismien selektiivinen rikastuminen ravistelupullokokeissa havaittiin rikastetun biomassan mikrobidiversiteetin suppeudesta alkuperäiseen näytteeseen verrattuna. Maljakasvatusmenetelmän avulla eristettiin vain viisi todennäköisesti erilaista pesäkettä, joka havainnollistaa selkeästi menetelmän valikoivuuden ja sen antaman puutteellisen kuvan mikrobiston monimuotoisuudesta.

## ABSTRACT

TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Master's Degree Programme in Biotechnology

**SAASTAMOINEN, HEIDI:** Microbes in fuel storage and distribution

Master of Science Thesis, 97 pages

July 2011

Major: Environmental Biotechnology

Supervisor: PhD Kathryn Wakeman

Examiner: Professor Jaakko Puhakka

Keywords: fuel, storage, distribution, microbe, microbial contamination, microbial diversity, control of microbial growth

Hydrocarbons in fuels have known to support microbial growth for over 70 years. One aim of this thesis was to update the literature review with current knowledge of microbiological contamination of fuels. The aim of the experimental part of the thesis was to study how the fuels support microbial growth, the number and the diversity of microbes in fuels as well as how deterioration of fuels progresses, can be prevented and limited.

Two fuels were studied in the experimental part of the thesis. Three microbial growing habits were used to study how the fuels support microbial growth: solid media, liquid water phase using shake flasks and biofilm. Fuel 1 cannot be used as a carbon source as itself, as it does not absorb in the solid media. Microorganisms present in the fuel 1 were enriched during the shake flask experiments and both studied fuels supported microbial growth. Mineral salts media was observed to enhance and low pH to limit microbial growth in the fuels. Biofilm microbial growth on microscope slides covered with fuel 1 storage tank-lining material was detected at both fuel 1 phase and at liquid water phase. Water availability and low pH were observed to limit biofilm formation.

The effect of temperature on microbial growth kinetics in the fuel 1 was studied with shake flasks at three temperatures. Microbial growth was observed to be fastest at 27°C while a delay and slower microbial growth was observed at 37°C. No microbial growth was detected at 6°C during the study period. Limitation of microbial growth was studied in anaerobic conditions in the fuel 1. No microbial growth was detected during the study period. Microbial growth in fuels can be limited with water availability, low pH and temperature as well as anaerobic conditions. Limited water availability in a fuel storage tank can be achieved with regular and careful water removal. The technical feasibility and financial analysis should be conducted for implementing anaerobic conditions in a full-scale fuel storage environment.

The number of microbes in fuel 1 was studied with a cultivation method based on standard IP 385/99 and by microscope quantification. Both aerobic viable counts (11 – 15 CFU/ml) and total cell counts (453 – 1271 cells/ml) were very low in the studied samples. Microbial diversity in fuel 1 was studied with molecular methods. The prokaryotic diversity of the samples was wide while the eukaryotic diversity was low. Selective enrichment of microorganisms in the shake flask experiments was observed, as the microbial diversity of the enriched biomass was low compared with the original fuel sample. Only five possibly different colonies were isolated from the fuel 1 with the cultivation method, which clearly illustrates the selectivity of the method and the inadequate view about microbial diversity it presents.

## ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty yhteistyössä Neste Oil Oyj:n ja Tampereen teknillisen yliopiston Kemian ja biotekniikan laitoksen kanssa. Työn on rahoittanut Neste Oil Oyj.

Kiitän Neste Oil Oyj:n Perttu Koskista ja Pirjo Saikkosta mahdollisuudesta mielenkiintoiseen diplomityöhön sekä neuvoista työni eri vaiheissa. Työni ohjaajaa Jaakko Puhakkaa haluan kiittää asiantuntevasta opastuksesta ja arvokkaista kommentteista työni aikana. I would also like to thank my other supervisor, Dr. Kathryn Wakeman, for all her advisement, encouragement and inspiration during my thesis work. Anni Kolliä ja Kirsi Määttä kiitän geenifragmenttien erottelusta denaturoivalla gradienttigeelielektroforeesilla. Hanna Hynystä kiitän avusta lämpötila- ja anaerobitutkimuksissa sekä biofilmitutkimuksessa, näiden tutkimusten tulosten käsittelyssä sekä avusta molekyylibiologisissa töissä. I also thank Kathryn Wakeman for the molecular biology work and the analysis of sequencing results. Marika Nissilää kiitän haihtuvien rasvahappojen analysoinnista. Kiitokset myös työtovereilleni Kemian ja biotekniikan laitoksella.

Lopuksi kiitos Vesalle tuesta ja kannustuksesta opiskeluissani ja niiden ulkopuolella. Miko-pojalle kiitos siitä, että muistutat mikä on todella tärkeää. Lämmin kiitos myös Telle-äidille ja Hannu-isälle.

Tampereella 7.7.2011

Heidi Saastamoinen

## SISÄLLYS

1.	Johdanto .....	1
2.	Polttoaineet.....	3
2.1.	Valmistus ja koostumus .....	3
2.1.1.	Mineraalidiesel ja lentopetroli .....	3
2.1.2.	Biodiesel (FAME).....	4
2.1.3.	Uusiutuvista raaka-aineista valmistettu diesel.....	5
2.2.	Polttoaineiden varastointi ja jakelu .....	6
2.2.1.	Polttoaineiden varastointi .....	6
2.2.2.	Polttoaineiden jakelu.....	7
3.	Polttoaineiden mikrobimääritys- ja seurantamenetelmät .....	8
3.1.	Mikrobikasvun indikaattorit.....	8
3.2.	Perinteiset/standardimenetelmät .....	8
3.2.1.	Mikroskopointi.....	8
3.2.2.	Kasvatusmenetelmät .....	9
3.3.	Molekyylibiologiset menetelmät.....	10
3.3.1.	Mikrobien metabolinen aktiivisuus .....	10
3.3.2.	Adenosiinitrifosfaattipitoisuus.....	11
3.3.3.	Rasvahappoanalyysi.....	11
3.3.4.	Immunologiset menetelmät.....	11
3.3.5.	Polymeraasiketjureaktioon perustuvat menetelmät .....	12
4.	Mikrobien esiintyminen ja kasvu polttoaineiden varastoinnissa ja jakelussa.....	18
4.1.	Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi .....	18
4.1.1.	Mineraalidiesel ja lentopetroli .....	18
4.1.2.	Biodiesel (FAME).....	23
4.1.3.	Uusiutuvista raaka-aineista valmistettu diesel.....	23
4.2.	Polttoaineiden mikrobidiversiteetti .....	23
4.2.1.	Mineraalidiesel ja lentopetroli .....	23
4.2.2.	Biodiesel (FAME).....	31
4.3.	Haitallisimmat mikrobit .....	31
5.	Polttoaineiden mikrobiologinen kontaminaatio .....	32
5.1.	Kontaminaation alkuperä ja leviäminen jakelussa.....	32
5.2.	Polttoaineiden varastointi ja jakelu mikrobien kasvuympäristönä.....	32
5.2.1.	Fysikaaliset ja kemialliset olosuhteet varastoinnissa.....	32
5.2.2.	Mikrobien kasvu eri faaseissa.....	35
5.2.3.	Haitalliset mikrobipitoisuudet.....	36
5.3.	Kontaminaation vaikutukset polttoaineen laatuun ja varastoitavuuteen.....	37
5.4.	Kontaminaation ja mikrobien kasvun esto ja hallinta .....	38
5.4.1.	Varastointi- ja jakelurakenteet .....	38
5.4.2.	Fysikaaliset toimenpiteet .....	38
5.4.3.	Kemikaalit.....	39

5.4.4.	Biologinen torjunta .....	40
6.	Materiaalit ja menetelmät.....	42
6.1.	Mikrobien kasvu ja sen hallinta polttoaineissa .....	42
6.1.1.	Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi.....	42
6.1.2.	Lämpötilan vaikutus mikrobikasvuun polttoaineessa.....	46
6.1.3.	Mikrobikasvun hillintä polttoaineessa .....	47
6.2.	Mikrobit polttoaineessa.....	47
6.2.1.	Pesäkkeitä muodostavat yksiköt .....	47
6.2.2.	Kokonaissolumäärä mikroskopoinnin avulla.....	49
6.2.3.	Molekulaariset menetelmät.....	50
7.	Tulokset.....	56
7.1.	Mikrobien kasvu ja sen hallinta polttoaineissa .....	56
7.1.1.	Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi.....	56
7.1.2.	Lämpötilan vaikutus mikrobikasvuun polttoaineessa.....	65
7.1.3.	Mikrobikasvun hillintä polttoaineessa .....	67
7.2.	Mikrobit polttoaineessa.....	67
7.2.1.	Pesäkkeitä muodostavat yksiköt .....	68
7.2.2.	Kokonaissolumäärä mikroskopoinnin avulla.....	69
7.2.3.	Molekulaariset menetelmät.....	70
8.	Tulosten tarkastelu .....	79
8.1.	Mikrobien kasvu ja sen hallinta polttoaineissa .....	79
8.1.1.	Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi.....	79
8.1.2.	Lämpötilan vaikutus mikrobikasvuun polttoaineessa.....	81
8.1.3.	Mikrobikasvun hillintä polttoaineessa .....	82
8.2.	Mikrobit polttoaineessa.....	82
8.2.1.	Pesäkkeitä muodostavat yksiköt .....	82
8.2.2.	Kokonaissolumäärä mikroskopoinnin avulla.....	83
8.2.3.	Molekulaariset menetelmät.....	83
9.	Johtopäätökset.....	85
	Lähteet.....	88

## LYHENTEET JA MERKINNÄT

<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate, adenosiinitrifosfaatti
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin , naudan seerumialbumiini
<b>DGGE</b>	Denaturing gradient gel electrophoresis, denaturoiva gradienttegelielektroforeesi
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleiinihappo
<b>DOC</b>	Dissolved organic carbon, liukoinen orgaaninen hiili
<b>EPS</b>	Extracellular polysaccharides, solunulkoiset polysakkaridit
<b>FDA</b>	Fluoreskiinidiasetaatti
<b>LH-PCR</b>	Length heterogeneity PCR, pituusheterogeenisyys-PCR
<b>MEA</b>	Malt extract agar, mallasuuteagar
<b>OSI</b>	Oil stability index, öljyn pysyvyysindeksi
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction, polymeraasiketjureaktio
<b>q-PCR</b>	Quantitative PCR, kvantitatiivinen PCR
<b>RFLP</b>	Restriction fragment length polymorphism, restriktiofragmenttien pituuspolymorfismi
<b>RISA</b>	Ribosomal intergenic spacer analysis, ribosomaalisten geenien välisen alueen pituuden heterogeenisyyden analysointi
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid, ribonukleiinihappo
<b>SRB</b>	Sulfate reducing bacterium, sulfaattia pelkistävä bakteeri
<b>TGGE</b>	Temperature gradient gel electrophoresis, lämpötila gradienttegelielektroforeesi
<b>TOC</b>	Total organic carbon, orgaaninen hiili
<b>T-RFLP</b>	Terminal restriction fragment length polymorphism, terminaalisten restriktiofragmenttien pituuspolymorfismi
<b>TS</b>	Total solids, kuiva-aine
<b>TSA</b>	Tryptone soya agar, tryptofaani-soija-agar
<b>VOC</b>	Volatile organic carbon, haihtuva orgaaninen hiili

# 1. JOHDANTO

Ensimmäisen kerran mikrobikasvua havaittiin öljytuotteissa vuonna 1895 ja siihen alettiin kiinnittää enemmän huomiota 1930-luvun lopulla (Miyoshi 1895; Carlson 1989, Saastamoisen 1996 mukaan). Lentopetrolin mikrobiologinen kontaminaatio on tunnistettu merkittäväksi ongelmaksi 1950-luvulta lähtien (Finefrock ja London 1968; Blanchard ja Goucher 1965; Bakanauskas 1958).

Mikrobikasvun on havaittu vaikuttavan polttoaineissa viidellä tavalla: 1) mikrobien fyysisen läsnäolon haittavaikutukset (rihmasienet ja solunulkoisia polysakkarideja muodostavat bakteerit), 2) mikrobien metabolian haittavaikutukset (lisäaineen hyödyllisyyden menetys) 3) mikrobien metaboliatuotteiden muodostuminen (orgaaniset hapot, rikkivety, rikkihappo ja ammoniakki), 4) biolietteen muodostuminen ja 5) mikrobien aiheuttama metallipintojen korroosio (Robbins ja Levy 2004; Chung et al. 2000). Kontrolloimaton polttoaineiden ja polttoainejärjestelmien mikrobikontaminaatio sekä siitä seuraavat ongelmat aiheuttavat merkittäviä taloudellisia menetyksiä (Passmann 2003).

Erilaiset polttoaineet tarjoavat hyvän hiilenlähteen erilaisille mikro-organismeille ja polttoaineita hiilen ja energian lähteenään käyttäviä mikro-organismeja esiintyy käytännössä kaikkialla: ilmassa, vedessä ja maaperässä. Hiilivetyjen biohajoavuus pienenee seuraavassa järjestyksessä: *n*-alkaanit, yksinkertaiset aromaattiset hiilivedyt (esimerkiksi bentseeni ja tolueni), haaroittuneet alkaanit, sykloalkaanit, isopreenit ja kondensoituneet polyaromaattiset hiilivedyt. (Yemashova et al. 2007). Bensiinin sisältämät lyhytketjuiset hiilivedyt, joilla on pieni molekyylipaino, voivat olla mikro-organismeille myrkyllisiä, koska ne liuottavat solukalvoja (Morgan ja Watkinson 1994). Lentopetroli koostuu pääasiassa C10-C16 alkaaneista ja mineraalidiesel pääasiassa C15-C22 alkaaneista (Neste Oil Oyj 2009; Gaylarde et al. 1999). Suurin osa hiilivetyjä käyttävistä mikro-organismeista pystyy hapettamaan polttoaineita, joiden hiilivetyketjujen pituus on C10-C20. Tästä syystä lentopetroli ja mineraalidiesel ovat hyvin alttiita mikrobikontaminaatiolle varastoinnin aikana. (Robbins ja Levy 2004).

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2003/30/EY tarkoituksena on edistää biopolttoaineiden ja muiden uusiutuvien polttoaineiden käyttöä liikenteessä. Biodieselin varastoinnissa on paljastunut ongelmia, jotka liittyvät pääosin biodieselin vesipitoisuuden ja mikrobien kasvuun (Klofutar ja Golob 2007). Biodiesel on tarjoaa hyvän ja energiataloudellisesti paremman hiilenlähteen aerobisille mikro-organismeille kuin mineraaliöljypohjainen polttoaine (Owsianiak et al. 2009; Ratledge 1994). Polttoaineiden mikrobiologinen kontaminaatio on edelleen yleinen ongelma ja sen odotetaan kasvavan biopolttoaineiden käytön kasvun myötä (Balster et al. 2006).



Tämän diplomityön yhtenä tavoitteena oli tehdä kirjallisuuskatsaus erilaisten polttoaineiden mikrobiologisesta kontaminaatiosta. Diplomityön kokeellisessa osuudessa tutkittiin kahta polttoainetta. Työn tavoitteena oli tutkia polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi, mikrobien määrää ja diversiteettiä eri polttoaineissa, polttoaineiden pilaantumisen etenemistä sekä mikrobikasvun hillitsemistä ja estoa.

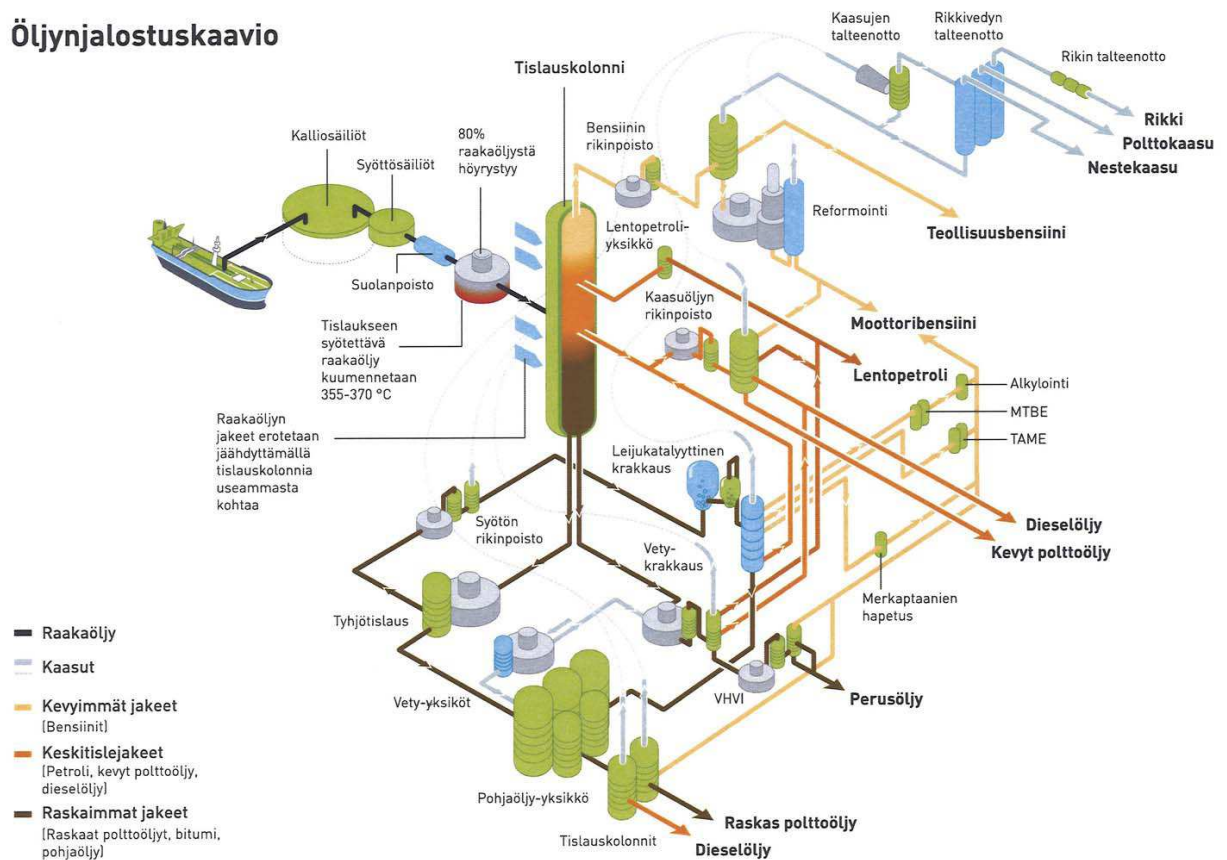
## 2. POLTTOAINEET

### 2.1. Valmistus ja koostumus

#### 2.1.1. Mineraalidiesel ja lentopetroli

Raakaöljy koostuu pääasiassa parafiinista, naftaleenista ja aromaattisista hiilivedyistä sekä alkuaineista (rikki, typpi, happi ja metallit). Raakaöljyn koostumus vaihtelee öljykentittäin ja alueittain. Öljynjalostusprosessissa syntyy valikoima erilaisia öljytuotekomponentteja (kuva 2.1). Öljynjalostusprosessi alkaa suolojen ja muiden epäpuhtauksien poistolla, jonka jälkeen raakaöljy erotetaan tislamalla jakeiksi. Osa öljytuotteista käytetään sellaisenaan. Jakeiden kemiallisia rakenteita muutetaan erilaisten jalostusoperaatioiden ja prosessien avulla (esimerkiksi rikinpoisto, reformointi ja krakkaus) tarkoituksenmukaisen koostumuksen aikaansaamiseksi. (Neste Oil Oyj 2009)

Öljynjalostuskaavio



**Kuva 2.1.** Neste Oil Oyj:n Porvoon jalostamon öljynjalostuskaavio (Neste Oil Oyj 2009).

Mineraalidiesel koostuu pääasiassa C15-C22 alkaaneista ja se sisältää polyaromaattisia hiilivetyjä (kaksi- ja kolmirenkaisia sekä raskaampia aromaatteja) alle 11 paino-%. Mineraalidieselin molekyylipaino on yleensä 212 – 294 g/mol, tiheys 800 – 845 kg/m<sup>3</sup> (+15°C) ja viskositeetti 1.2 – 4.5 mm<sup>2</sup>/s (+40°C). Suomessa käytettävien mineraalidieselien rikkipitoisuus on alle 0.001 %. Mineraalidieselissä käytettäviä lisäaineita ovat korroosionestoaineet, setaaniluvunkorottajat, puhdistavat lisäaineet, voitelevuuslisäaineet, vaahdonestoaineet sekä väri- ja merkkiaineet. (Neste Oil Oyj 2009; Gaylarde et al. 1999) Eurooppalaisen dieselstandardin (SFS-EN 590) mukaan mineraalidieselin vesipitoisuuden yläraja on 200 mg/kg (0.02 % tai 200 ppm).

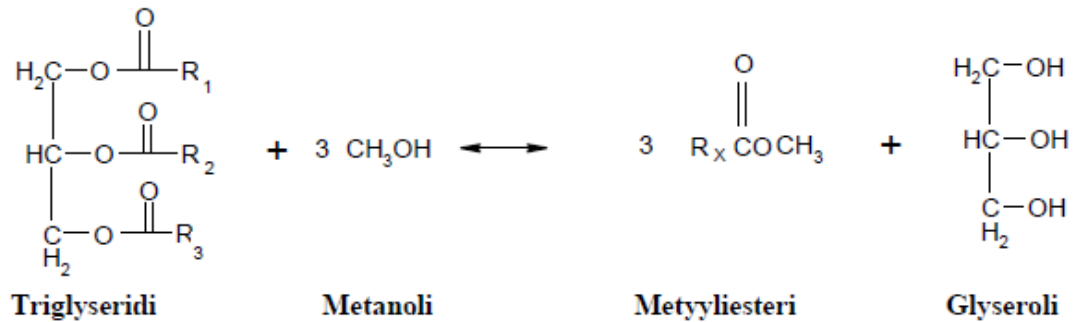
Lentopetroli koostuu pääasiassa C10-C16 alkaaneista ja sisältää aromaattisia hiilivetyjä alle 26.5 %. Lentopetrolin molekyylipaino on yleensä 156 – 226 g/mol, tiheys 788 – 840 kg/m<sup>3</sup> (+15°C) ja viskositeetti 1.3 – 1.5 mm<sup>2</sup>/s (+20°C). Suomessa valmistettavan lentopetrolin rikkipitoisuus on 0.03 paino-%. (Neste Oil Oyj 2009; Gaylarde et al. 1999)

### 2.1.2. Biodiesel (FAME)

Biodieselin raaka-aineena käytetään erilaisia uusiutuvia raaka-ainelähteitä kuten kasviöljyjä ja eläinrasvoja, joista valmistetaan dieselpolttoainetta esteröimällä. Biodieseliä voidaan valmistaa yli 350 öljykasvin öljystä tai lähes mistä tahansa rasvasta, niin puhtaasta eläinrasvasta kuin käytetystä paistinrasvastakin. Maailmanlaajuisesti merkittävimpiä öljykasveja ovat soijapapu, pähkinä, auringonkukka, saflor, puuvilla sekä Suomessa tärkeimmät rypsi ja rapsi. (Malkki 2006; Demirbas 2005)

Rasvat ja öljyt koostuvat lähes kokonaan triglyserideistä (glyserolin triestereistä), mutta rasvoissa esiintyy myös jonkin verran mono- ja diglyseridejä. Glyseridissä glyserolirakenteeseen on esterisidoksella liittyneenä yhdestä kolmeen rasvahappoketjua. Kasviöljyille on tyypillistä runsas kaksoissidosten määrä (tydyttymättömät rasvahapot), kun taas eläinrasvat eivät yleensä sisällä kaksoissidoksia (tydyttyneet rasvahapot). Kasviöljyjen rasvahappokoostumus vaihtelee sekä saman kasvin eri lajikkeiden että eri öljykasvien välillä. (Malkki 2006; Graboski ja McCormick 1998)

Biodieseliä valmistetaan vaihtoehtoesteröimisreaktiolla, jossa triglyseridin yhtenäisen glyserolirunko korvautuu kolmella alkoholin (esimerkiksi metanolin) alkyyliryhmällä ja muodostuu rasvahapon metyyliesteriä ja glyserolia (kuva 2.2). Reaktion katalyyttinä käytetään yleensä happoa (esimerkiksi suolahappo) tai emästä (esimerkiksi natrium- tai kaliumhydroksidi tai natriummetoksidi). (Malkki 2006; Demirbas 2005; Graboski ja McCormick 1998) Vaihtoehtoesteröityminen on tasapainoreaktio, johon vaikuttavat glyseridin ja alkoholin ainemääräsuhde, käytettävä katalyytti, lämpötila, paine, reaktioaika sekä vapaiden rasvahappojen ja veden määrä öljyssä (Demirbas 2005).

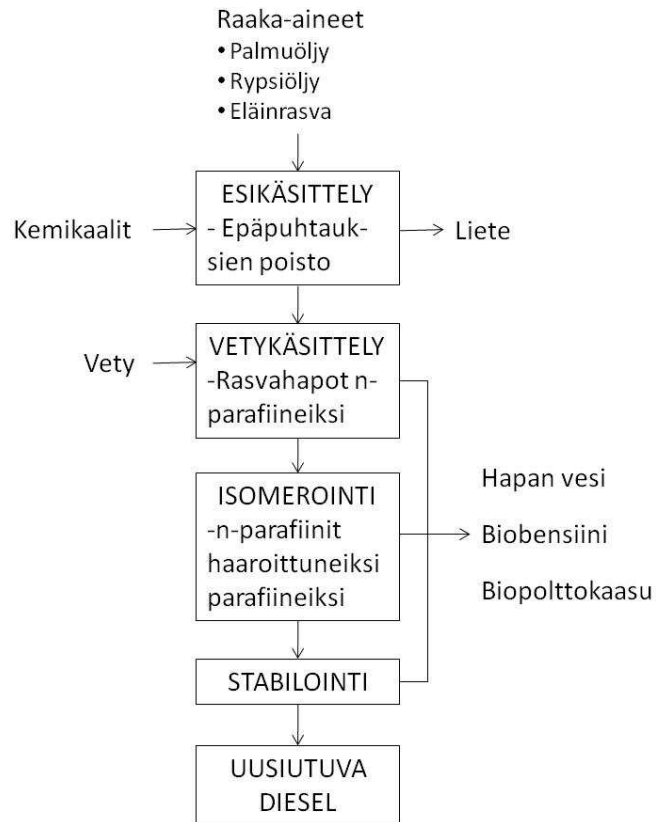


**Kuva 2.2.** Vaihtoehtoesteröitymisen kokonaisreaktio. Reaktioyhtälössä  $R_x$  kuvaa suoraa, haaroittumatonta hiiliketjua (Malkki 2006).

Biodiesel sisältää C12-C22 rasvahappojen metyyliestereitä ja se ei sisällä aromaattisia hiilivetyjä (Malkki 2006; Demirbas 2005). Eurooppalaisen biodieselstandardin (SFS-EN 14214) mukaan biodieselin tiheyden tulee olla 860 – 900 kg/m<sup>3</sup> (+15°C), viskositeetin 3.5 – 5.0 mm<sup>2</sup>/s (+40°C) ja biodieselin vesipitoisuuden yläraja on 500 mg/kg. Biodiesel ei sisällä rikkiä (Demirbas 2005).

### 2.1.3. Uusiutuvista raaka-aineista valmistettu diesel

Uusiutuvista raaka-aineista valmistettua dieseliä valmistetaan palmu- ja rypsiöljystä sekä eläinrasvoista patentoidulla vetykäsittelytekniikalla (kuva 2.3). Esikäsittelyn tarkoitus on poistaa epäpuhtauksia raaka-aineista. Prosessin ensimmäisessä vaiheessa rasvahapot vedytetään n-parafiineiksi ja toisessa vaiheessa n-parafiinit isomeroidaan edelleen haaraketjuisiksi parafiineiksi hyvien kylmäominaisuuksien saavuttamiseksi. (Neste Oil Oyj 2009; Neste Oil Oyj 2005)



**Kuva 2.3.** Uusiutuvista raaka-aineista valmistetun dieselin kaksivaiheisen tuotantoprosessin lohkokaavio. (Tekijän modifioima julkaisuista Stade ja Siitonen 2006; Neste Oil Oyj 2005).

Uusiutuvista raaka-aineista valmistettu diesel koostuu C12-C26 alkaaneista ja se ei sisällä aromaattisia hiilivetyjä. Uusiutuvista raaka-aineista valmistetun dieselin tiheys on yleensä  $770 - 790 \text{ kg/m}^3$  (+15°C), viskositeetti  $2.0 - 4.5 \text{ mm}^2/\text{s}$  (+40°C) ja vesipitoisuuden yläraja  $200 \text{ mg/kg}$  (0.02 % tai 200 ppm). Uusiutuvista raaka-aineista valmistettu diesel ei sisällä rikkiä. Uusiutuvista raaka-aineista valmistetussa dieselissä käytetään voitelu- ja sähkönjohtavuuslisäaineita. (Neste Oil Oyj 2009)

## 2.2. Polttoaineiden varastointi ja jakelu

### 2.2.1. Polttoaineiden varastointi

Polttoaineita voidaan varastoida joko maanpäällisissä tai maanalaisissa säiliöissä. Maanpäällisiä säiliöitä on kolmea tyyppiä: pallosäiliöt, uivakattoiset säiliöt ja kiinteäkattoiset säiliöt. Maanalaiset säiliöt ovat tyypiltään kalliosäiliöitä. (Hästbacka 1992)

Pallosäiliöissä varastoidaan tuotteita, jotka ovat ympäristön lämpötilassa ja paineessa kaasuja, mutta nestettä varastoituna paineen alaisena säiliössä (nestekaasut). Tuotteille, jotka eivät vaadi varastointia paineen alaisena, mutta jotka ovat suhteellisen helposti haihtuvia, käytetään uivakattoisia varastosäiliöitä haihtumisen minimoimiseksi (bensiniit). Joillekin polttoaineille käytetään myös katettuja uivakattoisia säiliöitä sadeveden

pääsyn estämiseksi (lentopetroli). Kiinteäkattoisia varastosäiliöitä käytetään polttoaineille, jotka eivät aiheuta haihtumistappioita (dieselpolttoaineet, kevyet ja raskaat polttoöljyt). Dieselin ja kevyen polttoöljyn säiliöt ovat yleensä eristämättömiä, mutta raskaiden polttoöljyjen säiliöt on eristettävä ja lämmitettävä tuotteen pumppausominaisuuksien säilyttämiseksi. (Hästbacka 1992)

Maanalainen kalliosäiliö on peruskallioon louhittu tila, jonka tilavuus voi olla satoja tuhansia kuutiometrejä. Säiliö louhitaan pohjavedenpinnan alapuolelle niin, että pohjavedenpaine on suurempi kuin varastoitavan tuotteen hydrostaattinen paine. Tällöin polttoaine ei voi tunkeutua pohjaveteen, mutta pohjavettä voi tihkua kallioista säiliöön. Suomessa kalliosäiliöt toteutetaan kiinteän vesipatjan periaatteella, jolloin säiliön pohjalla oleva vesikerroksen syvyys pidetään vakiona (0.5 – 1.0 m) pumppaamalla säiliöön tihkuva ylimääräinen vesi automaattisesti pois. (Hästbacka 1992)

### **2.2.2. Polttoaineiden jakelu**

Polttoaineiden jakelu tapahtuu joko säiliöautoilla, laivakuljetuksina tai rautateitse. Kotimaan polttoainekuljetukset tapahtuvat pääosin säiliöautoilla ja Neste Oil Oyj:n polttoainekuljetukset hoidetaan sopimusliikennöitsijöiden avulla. Kevytpolttoainekuljetuksissa on käytössä ns. aluekuljetusjärjestelmä. (Hästbacka 1992)

Laivakuljetustoiminta sisältää raaka-ainekuljetuksia jalostamoille sekä öljytuotekuljetuksia jalostamoilta ja muista hankintalähteistä omiin ja asiakkaiden varastokeskuksiin. Neste Oil Oyj:n laivakuljetukset hoidetaan ensisijaisesti Neste Oil Oyj:n omalla tai rahtaamalla kuljetuskalustolla. (Hästbacka 1992)

Rautatiekuljetustoiminta sisältää raaka-aineiden hankintakuljetuksia (pääosin Venäjältä) sekä öljytuotekuljetuksia kotimaan asiakkaille. Tuonnin kuljetuskalustona ovat ulkomaiset rautatievaunut ja kotimaan liikenteessä Valtionrautateiden kuljetuskalusto. (Hästbacka 1992)

### **3. POLTTOAINEIDEN MIKROBIMÄÄRITYS- JA SEURANTAMENETELMÄT**

#### **3.1. Mikrobikasvun indikaattorit**

Polttoaineiden mikrobikontaminaatiota voidaan seurata mikrobikasvun indikaattorien avulla ilman tarkkaa pitoisuuden määrittystä tai identifiointia. Mikrobin tuottamat aineenvaihduntatuotteet (esimerkiksi orgaaniset hapot, solunulkoiset polysakkaridit ja pinta-aktiiviset aineet) ovat myös merkittäviä epäpuhtauksia polttoaineissa. Niitä voidaan määrittää yksinkertaisin analyysimenetelmin tai pelkästään tarkkailemalla. (Gaylarde et al. 1999) Polttoaineessa esiintyvien mikrobin hapenkulutusta ja hiilidioksidin tuottoa voidaan myös seurata (Allsopp et al. 2004).

Saastamoinen (1996) vertasi polttoainenäytteiden vesipitoisuuksia, vesiliukoista alkaliteettia ja vesiliukoista orgaanista hiilipitoisuutta (TOC) näytteistä mitattuihin pesäkkeitä muodostaneiden yksiköiden määrään (määritetty nykyisin käytöstä poistettuun IP 385/88 standardin mukaiseen maljakasvatusmenetelmään perustuen), mutta niillä ei havaittu olevan yhteyttä. Saastamoisen (1996) mukaan liuenneen veden määrä riippui polttoaineen fysikokemiallisesta laadusta ja vesiliukoisen orgaanisen hiilipitoisuus kuvasi todennäköisesti mikrobin aktiivisuutta säiliössä, ei niinkään niiden määrää öljyssä.

Mikrobin hajottaessa polttoainetta rasvahapoiksi voi vesiliukoisen alkaliteetin odottaa nousevan ja korreloivan mikrobiitiheyden kanssa. Passmanin (2003) mukaan puhtaan tai hyvin vähän kontaminoituneen polttoainesäiliön vesifaasin ominaisuudet ovat lähellä sadevettä (pH 6 – 7 ja heikosti puskuroitu). Mikäli vesifaasin pH > 8 ja alkaliteetti > 1000 mg CaCO<sub>3</sub>/l on todennäköistä, että polttoaineen alkaaliset ainesosat ovat osittain erottuneet vesifaasiin. Vesifaasin pH < 6 ja alkaliteetti > 150 mg CaCO<sub>3</sub>/l indikoivat polttoaineen laadun biologista heikentymistä. (Passman 2003)

Edellä kuvattujen menetelmien avulla voidaan jossain määrin arvioida mahdollista mikrobikontaminaatiota, mutta indikaattorien avulla ei voida määrittää tarkkaa mikrobiitiheyttä.

#### **3.2. Perinteiset/standardimenetelmät**

##### **3.2.1. Mikroskopiointi**

Näytteen kokonaismikrobiitiheys voidaan määrittää mikroskoppoinnin avulla laskemalla mikrobin lukumäärä näytteessä. Mikroskoppoinnissa voidaan käyttää joko kuivattua näytettä tai nestenäytettä. Polttoaineiden tapauksessa näyte yleensä suodatetaan ja mikrobiitiheyden laskeminen tehdään suodattimelta. Valomikroskoopilla voidaan tarkastella

näytteen mikrobeita sellaisenaan, mutta epifluoresenssimikroskopoinnissa näytteen mikrobitt tulee värjätä havainnointia varten. (Yemashova et al. 2007; Madigan ja Martinko 2006)

Näytteen mikrobien havainnoinnin parantamiseksi voidaan käyttää erilaisia värjäysmenetelmiä. Fluoresoiva DNA-spesifinen DAPI (4',6'-diamidino-2-fenyyli-indoli) värjää kaikki näytteen solut eikä erottele eläviä ja kuolleita soluja. On olemassa myös elävät ja kuolleet solut erottelevia fluoresoivia kahden värin yhdistelmiä, mutta ne eivät sovellu luonnon mikrobinäytteiden värjäykseen epäspesifisen taustamateriaalin värjäyksen takia. (Madigan ja Martinko 2006)

Institute of Petroleum (IP) on julkaissut standardin polttoaineiden homepitoisuuden määrittämiseen (IP 472/02). Standardin mukaan näyte suodatetaan (0.45 tai 0.8 µm huokoskoko), jonka jälkeen hiivat mikroskopoidaan ja lasketaan suodattimelta.

Suorassa mikroskooppisessa laskennassa on muutamia rajoitteita. Menetelmä ei erottele kuolleita soluja, pienet bakteerit eivät välttämättä erotu riittävän hyvin ja jäävät huomioimatta, tarkkuus on rajattu ja menetelmä ei sovellu näytteille, joilla on pieni mikrobitiheys ( $<10^6$  solua/ml). (Madigan ja Martinko 2006) Polttoaineiden mikrobitiheys on yleensä suhteellisen pieni, mutta suodatus väkevöi polttoainenäytteessä esiintyvät mikrobit suodattimelle.

Saastamoisen (1996) mukaan mikrobien lukumäärän määrittäminen suodatetuista keskiraskaista polttoainenäytteistä oli vaikeaa, koska polttoaineissa esiintyi luontaisesti suuri määrä mikrobien kokoluokkaa olevia hiukkasia ja myös muut hiukkaset kuin mikrobit värjäytyivät huolimatta spesifisten värien käytöstä. Saastamoisen (1996) käyttämistä väriaineista kristallivioletti värjäsi bakteerisolut parhaiten ja Coomassie Brilliant Blue hiivasolut. Muiden käytettyjen väriaineiden (metyleenisininen, safraniini ja akridiini-oranssi) teho oli näitä kahta heikompi.

### 3.2.2. Kasvatusmenetelmät

Maljakasvatusmenetelmässä määritetään elinkykyisten solujen määrä näytteessä sopivan kasvatusalustan avulla. Menetelmä perustuu oletukseen, että jokainen elinkykyinen solu voi kasvaa ja jakautua muodostamaan yhden kasvupesäkkeen. Näyte joko pipetoidaan ja levitetään kasvualustalle tai näyte pipetoidaan steriilille petrimaljalle, jonka jälkeen elatusaine lisätään petrimaljalle. Tämän jälkeen näytteessä olevien mikro-organismien annetaan kasvaa (yleensä ennalta määrätyn ajan), jonka jälkeen muodostuneet pesäkkeet lasketaan. Näyte voidaan tarvittaessa laimentaa ennen kasvatusta. (Madigan ja Martinko 2006)

Maljakasvatusmenetelmä on riippuvainen elatusaineen sopivuudesta näytteessä oleville mikro-organismeille sekä kasvatusajasta ja -lämpötilasta. Kaikki mikro-organismit eivät kasva samalla nopeudella ja maljakasvatuksella voidaan määrittää niitä mikro-organismeja, joiden kasvuvaatimukset tunnetaan. (Madigan ja Martinko 2006) On arvioitu, että monien ympäristöjen bakteereista alle prosentti on kasvatettavissa (Amann et al. 1995).



Toinen yleinen kasvatusten menetelmä on MPN-menetelmä (most probable number). Tässä menetelmässä näytteestä tehdään laimennossarja ja laimennoksia kasvatetaan näyteputkissa, joissa on sopivaa elatusainetta. MPN-menetelmä pyrkii ilmaisemaan sitä laimennosrajaa, jolloin vielä havaitaan mikrobien kasvua näytteen laimennossarjassa. MPN-menetelmässä voidaan käyttää hyvin valikoivaa elatusainetta tietyn bakteerin tai bakteerijoukon tutkimiseen näytteestä. (Madigan ja Martinko 2006)

Institute of Petroleum (IP) ja American Society for Testing and Materials (ASTM) ovat julkaisseet standardit elinkykyisten aerobisten mikrobien määrittämiseen (IP 385/99) ja sulfaattia pelkistävien bakteerien määrittämiseen vesifaasista (D 4412-84). Standardi IP 385/99 perustuu öljynäytteen suodattamiseen (0.45 µm huokoskoko) ja öljyn erotukseen suodattimesta. Suodatin laitetaan joko sellaisenaan kasvatusalustalle tai mikrobit uuteen suodattimesta. Kasvatuksessa käytetään kahta elatusainetta, joista toinen on spesifinen bakteereille ja toinen hiivoille ja homeille. Kasvatusaika on 5 vuorokautta  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  lämpötilassa, jonka jälkeen muodostuneet pesäkkeet lasketaan. Standardi D 4412-84 perustuu sulfaattia pelkistävien bakteerien havaitsemiseen ja laskemiseen MPN-menetelmän avulla. Standardin esittämässä menetelmässä voidaan käyttää kahta vaihtoehtoista elatusainetta, joista toisen valmistukseen käytetään steriiliä vettä ja toiseen suodatettua näytevettä. Suodatettua näytevettä käytetään, kun näyte on peräisin epätyypillisestä ei-makeasta vesiympäristöstä. Sulfaattia pelkistäviä bakteereita esiintyy vesifaasisa ainoastaan polttoaineen ollessa hyvin kontaminoitunutta (Allsopp et al. 2004).

### **3.3. Molekyylibiologiset menetelmät**

#### **3.3.1. Mikrobien metabolinen aktiivisuus**

Aktiivisuusmääritykset perustuvat mikrobisoluissa tapahtuviin biokemiallisiin reaktioihin, yleensä entsyymiaktiivisuuksiin (Saastamoinen 1996). Fosfataasi on entsyymi, joka hydrolysoi orgaanisia fostaatteja, esimerkiksi adenosinitrifosfaattia (ATP) (Salkinoja-Salonen 2002). Mikrobien fosfataasiaktiivisuutta on käytetty polttoainesäiliöiden vesifaasin mikrobimäärän selvittämiseen ja fluoreskiinidiasetaattia (FDA) on käytetty biomassan aktiivisuuden määrittämiseen. Fosfataasiaktiivisuuden määrittäminen perustuu 4-nitrofenyylifosfaatin hydrolyysin tuottaman värillisen 4-nitrofenolin määrittämiseen spektrofotometrisesti. Biomassan aktiivisuuden määrittäminen perustuu mikrobien aiheuttaman fluoreskiinidiasetaatin hydrolysointiin, jolloin tuotteena syntyy vihreän keltainen fluoreskiini. Fluoreskiinipitoisuus voidaan määrittää spektrofotometrisesti. (Saastamoinen 1996)

Saastamoinen (1996) selvitti fosfataasiaktiivisuuden määrittämisen näytteestä ja fluoreskiinidiasetaatin hajoamisen määrittämisen soveltuvuutta polttoaineiden mikrobiitiheyden määrittämiseen. Fosfataasiaktiivisuusmäärittämissä rinnakkaisten näytteiden hajonta osoittautui suureksi ja kaikkien näytteiden aktiivisuus oli pienempi kuin menetelmän detektoriraja. Myös fluoreskiinidiasetaatin hajoamismäärittämissä mikrobiaktiivisuus oli

liian pieni sovellukseen ja mitatut fluoreskiinipitoisuudet olivat menetelmän detektiorajaa pienempiä.

### 3.3.2. Adenosiinitrifosfaattipitoisuus

Adenosiinitrifosfaatti (ATP) on kaikkien maapallolla elävien eliöiden energiatalouden väline. Sitä tuotetaan energiaa tuottavien reaktioiden avulla sekä käytetään solujen rakennusaineeksi ja solujen muihin toimintoihin. (Salkinoja-Salonen 2002) American Society for Testing and Materials (ASTM) on julkaissut standardin mikro-organismien adenosiinitrifosfaattipitoisuuden määrittämisestä vedessä (D 4012-81), joka perustuu mikro-organismien käsittelyyn niin, että soluissa oleva ATP vapautuu. Vapautunut ATP ja lusiferiini reagoivat keskenään lusiferaasi entsyymien kanssa. Reaktio on valoa tuottava, jolloin mitattu valon määrä on verrannollinen ATP-pitoisuuteen. Menetelmää käytetään elinkykyisten mikrobien määrän arvioimiseen näytteestä. (Salkinoja-Salonen 2002; D 4012-81)

Saastamoinen (1996) tutkimuksessa ATP-pitoisuuden määrittäminen keskiraskaista polttoainenäytteistä vaati esikasvatuksen. Näytteistä mitattu ATP-pitoisuuden ja pesäkkeitä muodostaneiden yksiköiden (määritetty nykyisin käytöstä poistettuun IP 385/88 standardin mukaiseen maljakasvatusmenetelmään perustuen) välille ei saatu tarkkaa korrelaatiota. Saastamoinen (1996) arveli tämän johtuvan muun muassa mikrobien epätasaisesta jakautumisesta öljyssä. Bakteerien ATP-tuoton on havaittu kasvavan erilaisissa stressitilanteissa ainakin *Esterichia colin* ja *Bacillus subtiliksen* kohdalla (Soini et al. 2005; Maul et al. 1995). Toisin sanoen ATP-pitoisuus ei välttämättä korreloi luotettavasti näytteen mikrobiitiheyden kanssa.

### 3.3.3. Rasvahappoanalyysi

Näytteen bakteerilajien identifiointiin voidaan käyttää solukalvojen fosfolipidien rasvahappoanalyysiä. Rasvahappoanalyysissä määritetään rasvahappojen tyypit ja esiintymissuhteet bakteerien solukalvoissa. Prokarioottien rasvahappokoostumus on hyvin vaihteleva ja sen perusteella voidaan usein tunnistaa tiettyjä bakteerilajeja. Rasvahapot eristetään standardoiduissa olosuhteissa viljellyistä bakteerisoluista ja muunnetaan kemiallisesti metyyliesteriksi, jotka voidaan tunnistaa kaasukromatografialla. Rasvahappoanalyysin kromatogrammeja voidaan verrata tunnettujen, samanlaisissa olosuhteissa kasvatettujen bakteerilajien rasvahappoprofiilitietokantoihin. Rasvahappoanalyysimenetelmä vaatii tiukan standardoinnin, sillä bakteerien rasvahappoprofiilit voivat vaihdella eri kasvatusolosuhteissa. (Madigan ja Martinko 2006)

Rauch et al. (2006) eristivät bakteereita lentopetrolinäytteistä ja tunnistivat niitä rasvahappoanalyysin avulla. He tunnistivat kaikkiaan 17 bakteerilajia tällä menetelmällä.

### 3.3.4. Immunologiset menetelmät

Vasta-aineet ovat spesifisiä biologisia proteiineja, jotka reagoivat antigeenin kanssa. Antigeeni voi olla esimerkiksi tietyn mikro-organismin pinnalla oleva rakenne, jonka

avulla kyseinen mikro-organismi voidaan tunnistaa. (Madigan ja Martinko 2006; Glick ja Pasternak 2003) Immunologisia vasta-ainemenetelmiä voidaan käyttää erilaisten (esimerkiksi fluoresoivien) merkkiaineiden kanssa, mikä helpottaa tulosten määrittystä (Yemashova et al. 2007; Madigan ja Martinko 2006). Menetelmän käyttö edellyttää tutkittavalle mikro-organismille spesifisen vasta-aineen valmistusta, joka on usein aikaa vievää ja työlästä. Joillekin mikro-organismeille on kaupallisesti saatavilla spesifisiä vasta-aineita. (Madigan ja Martinko 2006)

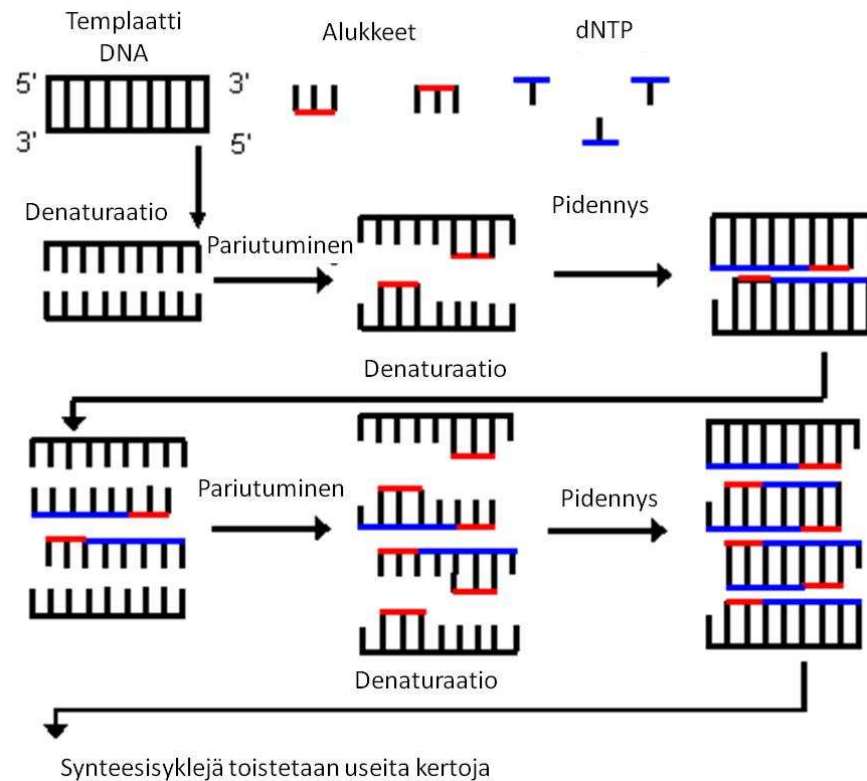
Lopes ja Gaylarde (1996) kehittivät *Hormoconis resinae* tunnistamiseen epäsuoran immunofluoresenssin menetelmän tälle homeelle spesifisen vasta-aineita sisältävän seerumin avulla. Menetelmä osoittautui hyvin herkäksi ja spesifiseksi. Menetelmä oli myös huomattavasti nopeampi (5 h) verrattuna viljelymenetelmiin (useita vuorokausia).

Immunologiset menetelmät ovat lajispesifisiä ja kaikille polttoaineessa esiintyville mikro-organismeille spesifisiä vasta-aineita ei ole mahdollista käyttää samanaikaisesti. Tästä syystä immunologiset menetelmät eivät sovellu polttoaineen koko kokonaismikrobimäärän määrittämiseen. Mikäli on tiedossa hyvin yleinen esiintyvä tiettyä polttoainetta kontaminoiva mikro-organismi, tällaisista menetelmistä on hyötyä mikrobikontaminaation seurannassa ja lisäselvitysten tarpeen arvioinnissa. Esimerkiksi *Hormoconis resinae* esiintymistä lentopetrolissa voidaan seurata sen spesifisen vasta-aineen tunnistukseen perustuvan FUELSTAT™ *resinae* testipakkauksen (Codinia Bioscience, Iso-Britannia) avulla.

### 3.3.5. Polymeerasiketjureaktioon perustuvat menetelmät

#### *Polymeerasiketjureaktio*

Polymeerasiketjureaktio (PCR) on menetelmä, jossa tietystä DNA-sekvenssistä tuotetaan kopioita *in vitro* ("koeputkessa") spesifisten alukkeiden ja DNA-polymeeraasi entsyymin avulla toistamalla useita synteesisyklejä. PCR-menetelmän käyttö vaatii DNA-molekyylien eristämisen soluista. Yksi PCR-sykli koostuu kolmesta vaiheesta: kopioitavan DNA-molekyylin kaksoisjuosteen denaturaatio, spesifisten oligonukleotidialukkeiden kiinnittyminen kumpaankin DNA:n vastinjuosteeseen ja pidennysvaihe, jossa DNA-polymeeraasi muodostaa kopion kummastakin DNA:n vastinjuosteesta. Näitä syklejä toistetaan useita ja jokaisen syklin aikana kopioitavan DNA-molekyylin määrä kaksinkertaistuu. PCR-menetelmän avulla yhdestä DNA-molekyylistä voidaan tuottaa useita miljoonia kopioita. (Madigan ja Martinko 2006; Glick ja Pasternak 2003) Polymeerasiketjureaktion vaiheet on esitetty kuvassa 3.1.



**Kuva 3.1.** *Polymeraasiketjureaktion vaiheet (Kaksonen 2009).*

Näytteen mikrobidiversiteettiä voidaan tutkia ribosomaalista RNA-molekyyliä koodaavien geenien avulla. Solujen proteiinisynteesi tapahtuu ribosomeissa, jotka koostuvat ribosomaalisesta ribonukleiinihaposta (rRNA) ja proteiinista. Sekä prokariooteilla että eukariooteilla ribosomit koostuvat isosta ja pienestä ribosomiyksiköstä. Prokariooteilla on pienessä ribosomiyksikössä 16S rRNA- ja eukariooteilla 18S rRNA-molekyyli, jota koodaavia geenejä voidaan käyttää mikrobidiversiteetin tutkimiseen. Nämä geenit ovat yleisesti esiintyviä, niillä on sama tehtävä mikro-organismeissa ja lisäksi ne sisältävät sekä vaihtelevia että hyvin säilyneitä alueita. Erityisesti tietoa prokarioottien 16S rRNA-geeneistä on laajasti saatavilla kansainvälisissä genitietokannoissa. 18S rRNA-geenien sekvenssejä on tutkittu hiivoilla ja muilla sienillä. (Madigan ja Martinko 2006; Salakinoja-Salonen 2002). PCR-menetelmää voidaan käyttää näytteen mikrobien 16S tai 18S rRNA-geenien monistukseen ja näitä geenejä edelleen näytteen mikrobidiversiteetin tutkimiseen.

Rauch et al. (2006) eristivät bakteereita lentopetrolinäytteistä ja tunnistivat niitä 16S rRNA-geenien sekvensoinnilla PCR-menetelmän avulla. He tunnistivat kaikkiaan 16 bakteerilajia tällä menetelmällä.

### ***Kvalitatiiviset menetelmät***

Näytteen mikrobidiversiteetin tutkiminen 16S tai 18S rRNA-geenien avulla voidaan yhdistää näiden geenien monistukseen PCR-menetelmän avulla ja PCR-tuotteina saatujen 16S tai 18S rRNA-geenifragmenttien erotteluun erilaisten DNA profilointitekniikoiden avulla (taulukko 3.1). Eroteltujen 16S tai 18S rRNA-geenifragmenttien emäsjärjestys

voidaan määrittää ja verrata niitä tietokantoihin, jolloin näytteessä esiintyvät mikrobilajit voidaan määrittää.

Yhdistämällä PCR-menetelmä erilaisiin DNA profiloointitekniikoihin voidaan määrittää suurempi määrä näytteessä esiintyviä mikro-organismeja kuin kappaleessa 3.2.2 kuvatuilla kasvatusmenetelmillä, mutta myös näitä menetelmiä rajoittavat rajalliset tietokannat. Vaikka tällä hetkellä tunnetaan useita tuhansia prokarioottilajeja, niiden kokonaismäärän on arvioitu olevan kaikkiaan jopa kymmenkertainen nykyisin tunnettuihin verrattuna (Madigan ja Martinko 2006).

**Taulukko 3.1. Erilaisia DNA profiloitintekniikoita, niiden kuvaus ja esimerkkejä käytöstä.**

Menetelmä	Kuvaus	Edut	Rajoitteet	Esimerkkejä käytöstä	Lähde
Denaturoiva gradienttielektroforeesi (DGGE)	DNA-fragmenttien erottelu emäskoostumuksen perusteella denaturoivassa gradienttiegeelissä (denaturoivat yhdisteet, esimerkiksi urea ja formamidi)	Soveltuu suurelle määrälle organismeja	Tarkkuus voi olla rajallista lyhyiden kohdesekvenssien takia (max. 500 bp). Kahden samantapaisen, mutta eri kannasta peräisin olevan DNA-fragmentin parituminen.	Mikrobiyhteisön rakenne, bakteerien identifiointi raakaöljyvarastosta (18 lajia)	Gilbride et al. 2006; Wang et al. 2008
Lämpötila gradienttielektroforeesi (TGGE)	DNA-fragmenttien erottelu emäskoostumuksen perusteella denaturoivassa gradienttiegeelissä (lämpötila)	Soveltuu suurelle määrälle organismeja	Kahden samantapaisen, mutta eri kannasta peräisin olevan DNA-fragmentin parituminen		Gilbride et al. 2006
Restriktiofragmenttien pituuspolymorfismi (RLFP)	PCR-tuotteiden pilkkominen restriktioentsyymeillä ja fragmenttien erottelu agarosiegelelektroforeesilla	Soveltuu suurelle määrälle organismeja	Ei sovellu spesifiseen mikrobilajien tunnistukseen, vaan kertoo erot mikrobiyhteisöjen tasolla	Aktiivilietteen mikrobi-diversiteetti	Gilbride et al. 2006
Terminaalisten restriktiofragmenttien pituuspolymorfismi (T-RLFP)	PCR-tuotteiden pilkkominen endonukleaasi restriktioentsyymillä ja fragmenttien erottelu kapillaarielektroforeesilla	Soveltuu suurelle määrälle organismeja, nopea tekniikka	DNA:ta ei voi sekvensoida analyysin jälkeen. PCR-tuotteesta täytyy tehdä kloonikirjasto sekvenssien tunnistamiseksi.	Sellutehtaan mikrobiyhteisön rakenne, raakaöljyllä saatuneen maan mikrobiyhteisön rakenne bioremediaation aikana	Gilbride et al. 2006; Mills et al. 2003
Pituusheterogeenisyyso-PCR (LH-PCR)	16S rRNA-geenin jonkin vaihteluvan alueen monistus, erotus polyakryyliamidigelelektroforeesilla ja eripituisten fragmenttien suhteellisen osuuden kvantifiointi	Soveltuu suurelle määrälle organismeja, nopea tekniikka	DNA:ta ei voi sekvensoida analyysin jälkeen. PCR-tuotteesta täytyy tehdä kloonikirjasto sekvenssien tunnistamiseksi.	Raakaöljyllä saatuneen maan mikrobiyhteisön rakenne bioremediaation aikana	Mills et al. 2003
Ribosomaalisten geenien välisen alueen pituuden heterogeisyyden analysointi (RISA)	Ribosomaalisten geenien (16S ja 23S) välisen alueen monistus, erotus elektroforeesilla ja eripituisten fragmenttien suhteellisen osuuden kvantifiointi	Soveltuu suurelle määrälle organismeja, suuri vaihtelu fragmenttien pituudessa	DNA:ta ei voi sekvensoida analyysin jälkeen. PCR-tuotteesta täytyy tehdä kloonikirjasto sekvenssien tunnistamiseksi.	Sellu- ja paperitehtaan jäteveden bakteeridiversiteetti ja yhteisön rakenne	Gilbride et al. 2006

### ***Kvantitatiiviset menetelmät***

Kvantitatiivisessa polymeraasiketjureaktiossa (q-PCR) määritetään polymeraasiketjureaktion kohde DNA-sekvenssin määrä PCR-tuotteiden määrän perusteella. Määrittäminen voidaan tehdä päätepistemäärityksenä tai reaaliaikaisena määrittämisnäytteenä. Kun kohde DNA-sekvenssi on valittu sopivasti, sen määrän perusteella voidaan määrittää näytteen mikrobien lukumäärä. (Kaksonen 2009; Freeman et al. 1999)

Päätepistemäärityksessä jokaisen PCR-synteesisyklin jälkeen otetaan PCR-tuotteesta näyte. Näyte analysoidaan geielektroforeesilla ja DNA:n määrä jokaisen syklin jälkeen määritetään. Näytteitä otetaan PCR-monistuksen eksponentiaalivaiheen aikana, jolloin teoriassa kopioitavan DNA-molekyylin määrä kahdentuu kunnes reaktioseoksen ainesosien määrä tulee rajoittavaksi (tasannevaihe). (Kaksonen 2009; Freeman et al. 1999) Kohde DNA-sekvenssin määrä voidaan laskea seuraavan yhtälön avulla (Freeman et al. 1999):

$$P = T \cdot (1+E)^n \quad (3.1)$$

missä P = PCR-tuotteiden määrä

T = alkuperäisen DNA-sekvenssin määrä

E = PCR-synteesisyklin aikana kopioituneen DNA:n osuus (0...1)

n = PCR-synteesisykliin lukumäärä

Reaaliaikaisessa määrittämisessä PCR-tuotteen määrää seurataan reaaliaikaisesti PCR-prosessin aikana PCR-laitteessa esimerkiksi kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvan fluoresoivan väriaineen avulla. Määrittämisessä käytetään standardinäytteitä, joissa on vaihteleva pitoisuus kohde DNA-sekvenssiä. Jokaisen standardinäytteen alkupitoisuudelle saadaan kynnysarvo huomioimalla taustafluoresenssi. Alkupitoisuuksien kynnysarvojen perusteella voidaan määrittää standardisuora, jonka perusteella tuntemattoman näytteen kohde DNA-sekvenssin määrä voidaan määrittää. (Kaksonen 2009; Freeman et al. 1999)

Kvantitatiivista polymeraasiketjureaktiota on käytetty paljon erilaisissa käyttökohdeissa ja esimerkkejä ympäristösovelluksista on esitetty taulukossa 3.2. Aiemmin käytettiin pääasiassa päätepistemääritystä kohde DNA-sekvenssin määrän analysointiin, mutta nykyään reaaliaikainen määrittäminen on yleistynyt.

**Taulukko 3.2.** Esimerkkejä kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktion käyttökohteista ympäristösovelluksissa.

Määrittäminen	Kohdeorganismi	Kohde DNA-sekvenssi	Ympäristö	Lähde
Päätepiste-määrittäminen	Kasvattamaton maaperäbakteerikanta	16S rRNA-geeni	Viljelemättömän laitumen pintamaa	Lee et al. 1996
	<i>Enterobacter cloacae</i> kanta HO-1	16S rRNA-geeni	Kromaattia sisältävää jättevettä käsittelevä bioreaktori	Nowaza et al. 1998
	<i>Pseudomonas putida</i> BH ja <i>Comamonas</i> sp. kanta E6	<i>gyrB</i> -geeni, joka koodaa DNA-gyraasin B-alayksikköä	Fenolia käsittelevä laboratoriomittakäytävän aktiivilieteprosessi	Watanabe et al. 1998
Reaaliaikainen määrittäminen	Bakteerit ja arkit	16S rRNA-geeni	Kalifornian rannikkokeri	Suzuki et al. 2000
	Bakteerit, metanogeeniset arkit, <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanothermobacter</i> , <i>Methanosarcina</i> ja <i>Methanosaeta</i>	16S rRNA-geeni	Asetaattia käsittelevä anaerobireaktori	Sawayama et al. 2006
	<i>Methylobacter</i> / <i>Methylosarcina</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> ja <i>Methylocapsa</i>	<i>pmoA</i> -geeni, joka koodaa kiinteän metaanimonooksigenaasin $\alpha$ -alayksikköä	Niityn ja veden alla olevan riisipellon pintamaa	Kolb et al. 2003
	Bakteerit, nitrifioivat bakteerit, <i>Nitrospira</i> ja <i>Nitrosomonas oligotropha</i> kaltaiset bakteerit	16S rRNA-geeni ja <i>amoA</i> geeni, joka koodaa ammoniakki-monooksigenaasin aktiivista kohtaa	Kunnallisen jätevedenpuhdistamon aktiiviliete	Harms et al. 2003
	Denitrifioivat bakteerit	<i>nirK</i> -geeni, joka koodaa nitriittireduktaasia	Pellon, puutarhan ja sademetsän pintamaa (Ranska ja Kenia) sekä termiittipesä (Burkina Faso)	Henry et al. 2004
	<i>Desulfovibrionaceae</i> , <i>Desulfobacteraceae</i> ja <i>Desulfobulbus</i>	16S rRNA-geeni	Riisipellon pintamaa ja riisin juuret	Stubner 2004
	MBTE:tä hajottava bakteerikanta PM1	16S rRNA-geeni	MBTE:llä kontaminoitunut pohjavesiesiintymä (Kalifornia, Yhdysvallat)	Hristova et al. 2001



## 4. MIKROBIEN ESIINTYMINEN JA KASVU POLTTOAINEIDEN VARASTOINNISSA JA JAKE- LUSSA

### 4.1. Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi

Mikro-organismit tarvitsevat erilaisia ravinteita biosynteesiin ja energiantuottoon. Makroravinteita tarvitaan suuria määriä ja niistä tärkeimmät ovat hiili ja typpi. Tyypillisessä bakteerisolussa on noin 50 %TS hiiltä ja 12 %TS typpeä. Hiilenlähteitä ovat joko orgaaniset hiiliyhdisteet (esimerkiksi aminohapot, rasvahapot, orgaaniset hapot, sokerit, orgaaniset typpiyhdisteet, aromaattiset yhdisteet) tai epäorgaaninen hiilidioksidi (autotrofisille mikrobeille). (Madigan ja Martinko 2006; Passman 2003) Erilaiset polttoaineet tarjoavat hyvän hiilenlähteen erilaisille mikro-organismeille (Yemashova et al. 2007). Polttoaineiden hiilivetyjen on tiedetty ylläpitävän mikrobien kasvua jo yli 70 vuoden ajan (Van Hamme et al. 2003).

Typpi on tärkeä proteiinien, nukleiinihappojen ja useiden muiden solurakenteiden aineosa. Luonnossa typpeä esiintyy sekä epäorgaanisessa että orgaanisessa muodossa. Epäorgaanisia typen lähteitä ovat ammoniakki ( $\text{NH}_3$ ), nitraatti ( $\text{NO}_3^-$ ) ja typpikaasu ( $\text{N}_2$ ). Useimmat bakteerit pystyvät käyttämään ammoniakkia typenlähteenään ja monet myös nitraattia. Muita makroravinteita ovat fosfori, rikki, kalium, magnesium, kalsium ja natrium. (Madigan ja Martinko 2006; Passman 2003)

Mikroravinteita tarvitaan huomattavasti vähemmän kuin makroravinteita, mutta ne ovat välttämättömiä mikrobien kasvulle ja toiminnalle. Mikroravinteita ovat muun muassa koboltti, kupari, rauta, mangaani ja nikkeli. (Madigan ja Martinko 2006; Passman 2003)

#### 4.1.1. Mineraalidiesel ja lentopetroli

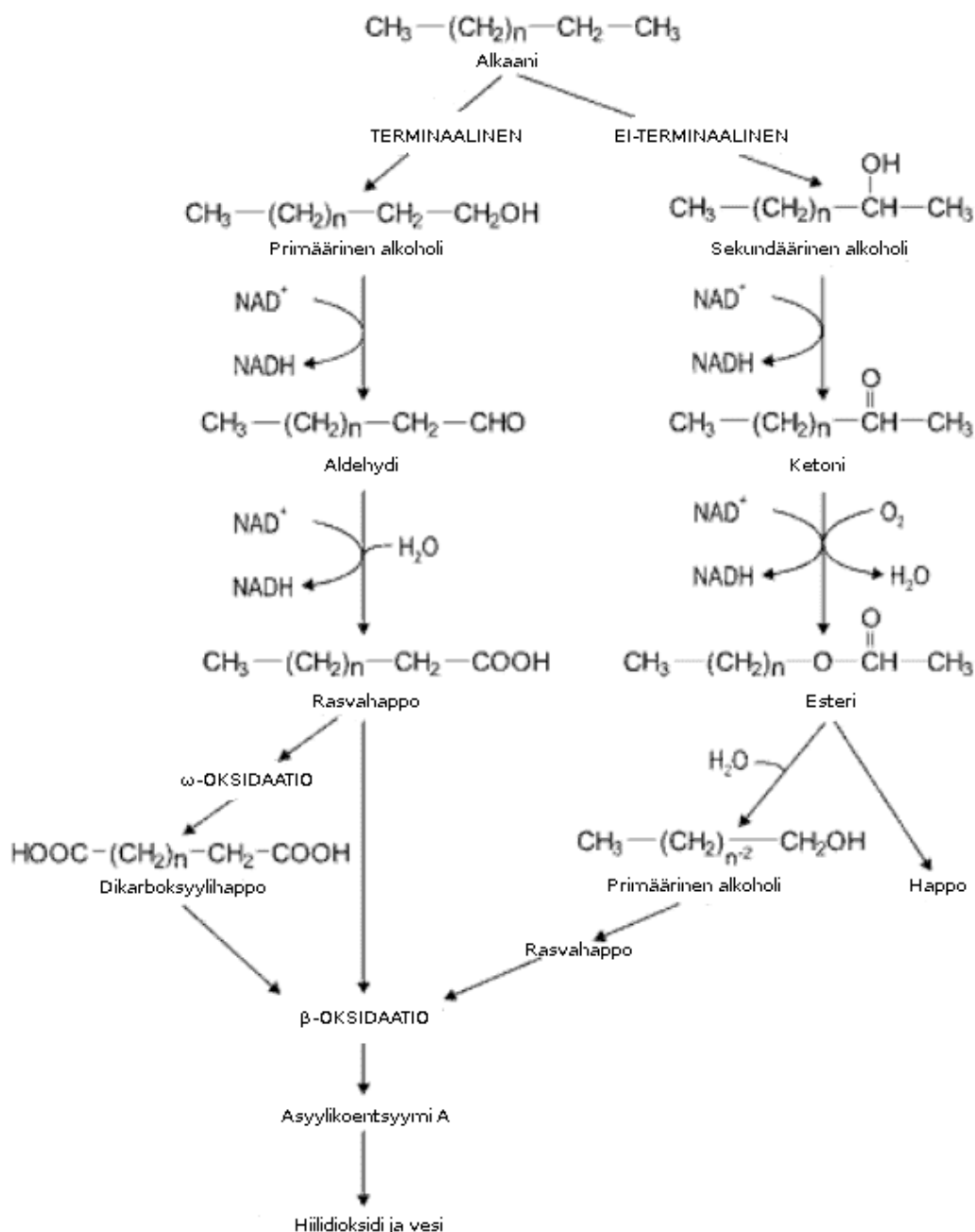
Mineraalidiesel koostuu pääasiassa C15-C22 alkaaneista ja sen molekyylipaino on yleensä 212 – 294 g/mol. Lentopetroli koostuu pääasiassa C10-C16 alkaaneista ja sen molekyylipaino on yleensä 156 – 226 g/mol. (Gaylarde et al. 1999) Lentopetroli sisältää aromaattisia hiilivetyjä alle 26.5 % ja mineraalidiesel polyaromaattisia hiilivetyjä (kaksi- ja kolmirenkaisia sekä raskaampia aromaatteja) alle 11 paino-% (Neste Oil Oyj 2009).

Polttoaineita hiilen ja energian lähteenään käyttäviä mikro-organismeja esiintyy käytännössä kaikkialla: ilmassa, vedessä ja maaperässä. Hiilivetyjen biohajoavuus pienenee seuraavassa järjestyksessä: *n*-alkaanit, yksinkertaiset aromaattiset hiilivedyt (esi-

merkiksi bentseeni ja tolueeni), haaroittuneet alkaanit, sykloalkaanit, isopreenit ja kondensoituneet polyaromaattiset hiilivedyt. (Yemashova et al. 2007). Suurin osa hiilivetyjä käyttävistä mikro-organismeista pystyy hapettamaan polttoaineita, joiden hiilivetyketjujen pituus on C10-C20 (Robbins ja Levy 2004). Lyhytketjuiset hiilivedyt, joilla on pieni molekyyliaino (esimerkiksi bensiinissä), voivat olla mikro-organismeille myrkyllisiä, koska ne liuottavat solukalvoja. Mikro-organismit voivat ottaa hiilivetyjä solujen sisälle kolmella eri mekanismilla: mikropisaroina (yleisin mekanismi yksisoluisilla organismeilla), makropisaroiden kuljetuksella tai yhdisteinä liukoisesta faasista (vain pienimolekyylliset yhdisteet). (Morgan ja Watkinson 1994)

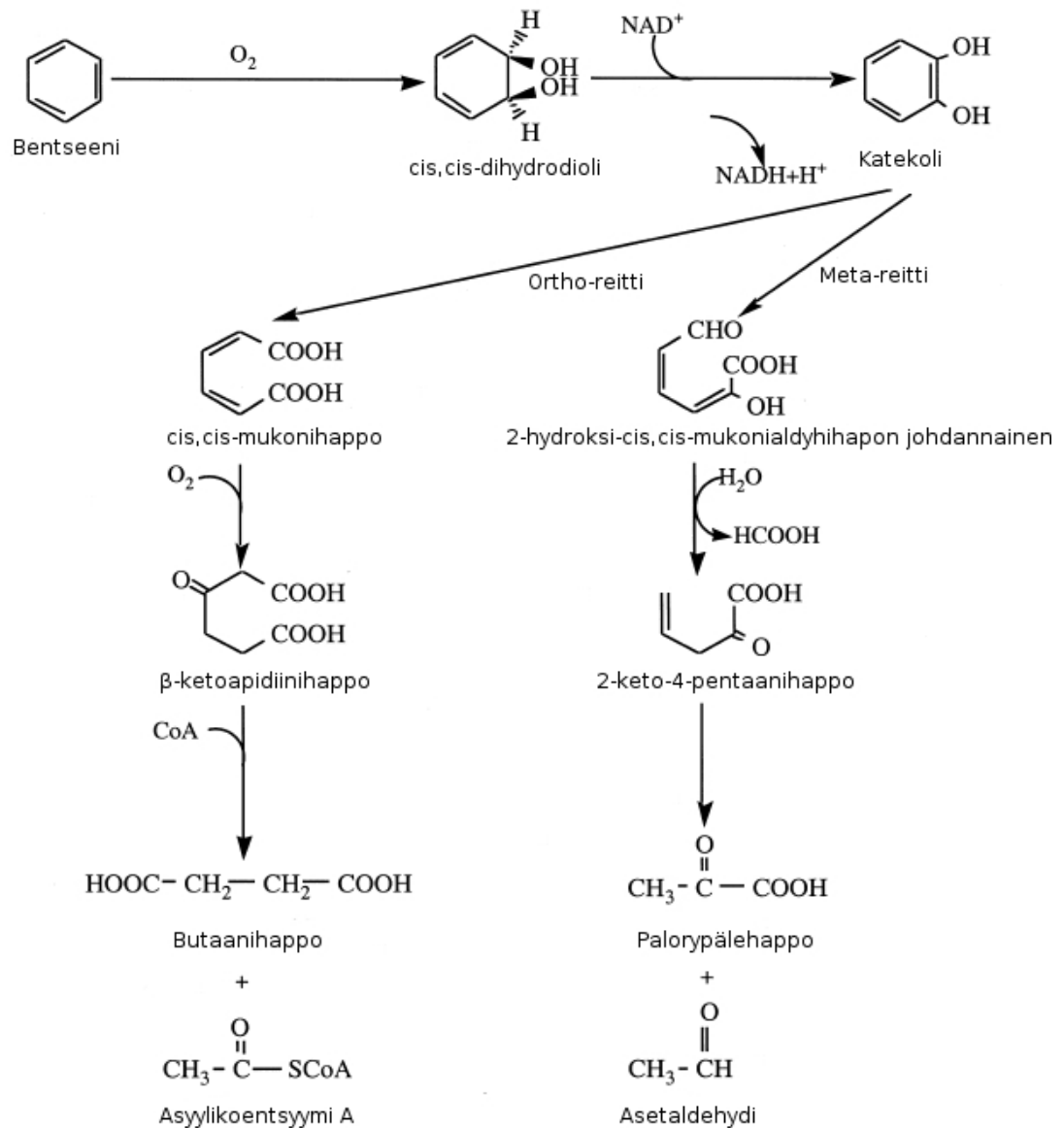
### ***Aerobiset olosuhteet***

Aerobisissa olosuhteissa alkaanien hajoamisessa ensimmäinen reaktio on alkaanien hapettuminen, jota katalysoivat molekylaarista happea vaativat mono-oksigenaasi tai dioksigenaasi entsyymit. Alkaanien aerobisia hajoamisreittejä on esitetty kuvassa 4.1. Mono-oksigenaasi hapettaa alkaanit primääriseksi alkoholiksi ja dioksigenaasi labiiliksi hydroperoksidiväliaineeksi, joka pelkistyy edelleen primääriseksi alkoholiksi. Yleensä ensimmäisenä hapettuu alkaanin terminaalinen metyyliryhmä, jolloin muodostunut primäärinen alkoholi hapettuu edelleen aldehydiksi ja rasvahapoksi. Tämä on yleisin hajoamisreitti. Jos alkaaniketjun ei-terminaalinen metyyliryhmä hapettuu, muodostuu sekundäärinen alkoholi. Tämä hapettuu edelleen ketoniksi ja sitten esteriksi, joka hydrolyytisesti pilkkoutuu hapoksi ja primääriseksi alkoholiksi. Primäärinen alkoholi hapetetaan rasvahapoksi. Mikäli molemmat alkaanin terminaaliset metyyliryhmät hapettuvat, muodostuu dikarboksyylihappo. Tätä reaktiota kutsutaan  $\omega$ -oksidaatioksi. Kaikissa tapauksissa rasvahapon muodostumisen jälkeen yhdiste pilkkoutuu edelleen  $\beta$ -oksidaatiolla. Rasvahappo muuntuu asyylikoentsyymi A-muotoon ja useat eri entsyymit katalysoivat rasvahapon muuntumista.  $\beta$ -oksidaatiossa yhdiste lyhenee kahdella hiiliyksiköllä ja sykli toistuu, kunnes alkaani on kokonaan mineralisoitunut hiilidioksidiksi ja vedeksi.  $\beta$ -oksidaatiosykli ei välttämättä vaadi molekylaarista happea, vaan rasvahapon hajoaminen voi tapahtua myös anaerobisissa olosuhteissa. (Atlas ja Bartha 1998; Morgan ja Watkinson 1994; Schwartz ja Leathen 1976)



**Kuva 4.1.** Alkaanien aerobisia hajoamisreittejä, joista terminaalinen on yleisin (Tekijän modifioima julkaisusta Fritsche ja Hofrichter 2005).

Aromaattiset hiilivedyt hapettuvat dioksigenaasi entsyymien katalysoimana labiileiksi *cis,cis*-dihydrodieleiksi, jotka spontaanisti muuttuvat edelleen katekoleiksi. Aromaattisen hiilivetyrenkaan aerobinen hajoaminen on esitetty kuvassa 4.2. Aromaattinen rengas aukaistaan joko ortho- tai meta-pilkkomisella. Ensimmäisessä vaihtoehdossa muodostuu *cis,cis*-mukonihappo, joka muunnetaan edelleen β-ketoapidiinihapoksi ja hapetetaan trikarboksyylikierron välituotteiksi. Toisessa vaihtoehdossa muodostuu 2-hydroksi-*cis,cis*-mukonialdyhihapon johdannainen, joka edelleen muuntuu muurahaishapoksi, palorypälehapoksi ja asetaldehydiksi. (Atlas ja Bartha 1998; Schwartz ja Leathen 1976)



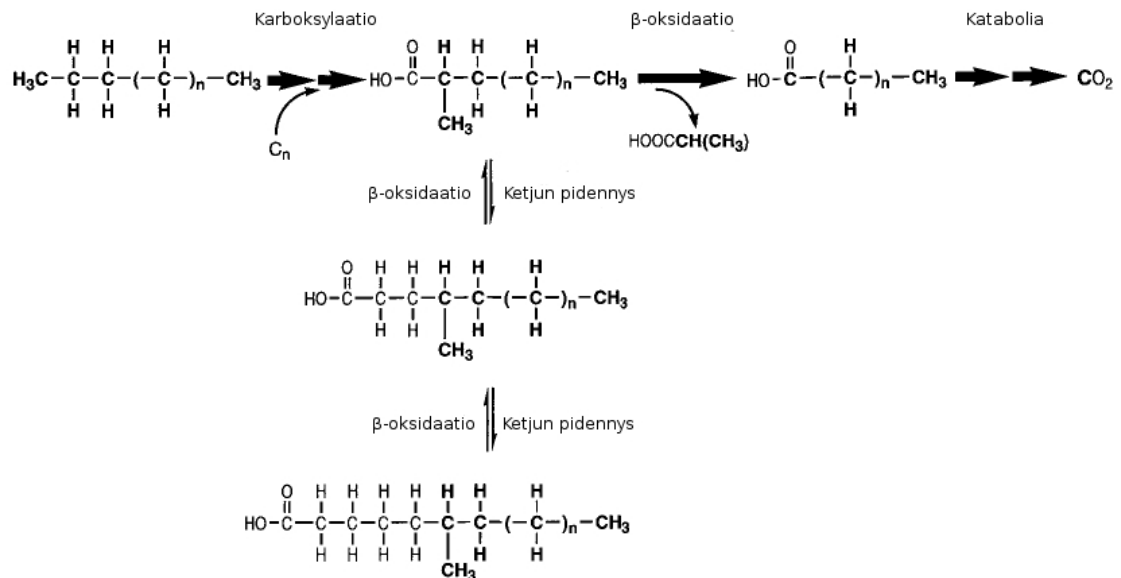
**Kuva 4.2.** Aromaattisen hiilivetyrenkaan aerobisen hajoaminen ortho- ja meta-pilkkomisella (Tekijän modifioima julkaisusta Juhasz ja Naidu 2000).

### Anaerobiset olosuhteet

Hiilivetyjen hajoaminen anaerobisissa olosuhteissa on huomattavasti hitaampaa kuin aerobisissa olosuhteissa. Hiilivetyjen anaerobinen hajoaminen rajoittuu myös rajalliseen määrään yhdisteitä ja on energiataloudellisesti huonompi vaihtoehto aerobiseen hajoamiseen verrattuna. (Atlas ja Bartha 1998; Schwartz ja Leathen 1976).

Sulfaattia pelkistävät bakteerit hajottavat alkaaneja anaerobisissa olosuhteissa. Anaerobinen hajoamisreitti on esitetty kuvassa 4.3. Ensimmäinen reaktio on alkaanin karboksylaatio. Metyyliryhmä, joka karboksyloidaan voi olla terminaalinen tai alkaanin kolmas hiili. Jälkimmäisessä vaihtoehdossa hiiliketjun kaksi viimeistä hiiliryhmää poistetaan, jolloin muodostuu rasvahappo. Ensimmäisessä vaihtoehdossa rasvahapon muodostuminen tapahtuu ilman välireaktioita. Tämän jälkeen muodostunut rasvahappo pilk-

koutuu edelleen  $\beta$ -oksideaatiolla. (So ja Young 1999; Young ja Phelps 2005) Myös denitrifioivien bakteerien on havaittu hajottavan pitkäketjuisia alkaaneja anaerobisesti (Van Hamme et al. 2003). Aromaatistien hiilivetyjen anaerobisessa hajoamisessa ensimmäinen reaktio on myös karboksylaatio. Tämän jälkeen aromaattinen hiilirengas pilkkoutuu sykloheksaanin johdannaisiksi. (Yemashova et al. 2007; Young ja Phelps 2005).



**Kuva 4.3.** Alkaanien anaerobinen hajoamisreitti, jossa pääreitti on merkitty lihavoiduin nuolin (Tekijän modifioima julkaisusta So ja Young 1999).

#### Lisäaineet ja muut ravinteet

Mikro-organismien tarvitsemia muita makro- ja mikroravinteita on saatavilla varastosäiliön vesifaasissa ja pohjalietteessä. Fosfori on usein yksi kasvua rajoittavista ravinteista, koska sitä on saatavilla yleensä alle 1 ppm. Polttoaineen lisäaineet voivat myös olla makro- ja mikroravinteiden lähteitä. Esimerkiksi orgaaniset amiinit ovat sekä typen että fosforin lähde. (Robbins ja Levy 2004)

Mineraalidieselin lisäaineilla on esitetty olevan polttoaineiden mikrobiologista hajoamista edistävä vaikutus. Bento ja Gaylarde (2001) vertasivat neljän homeen ja yhden hiivan (*Hormoconis resinae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii* ja *Candida silvicola*) kasvua lisäaineettomassa dieselissä kasvuun dieselissä, jossa oli lisäaineita. Käytettyjä lisäaineita olivat muun muassa pinta-aktiiviset aineet, korroosionestoaineet ja setaanilukua parantavat aineet. Bento ja Gaylarde (2001) eivät havainneet näiden lajien kasvussa eroa. Näiden mikro-organismien on kuitenkin todettu voivan käyttää polttoainetta hiilenlähteenä (taulukko 4.1, s. 24).

#### 4.1.2. Biodiesel (FAME)

Biodiesel sisältää C12-C22 rasvahappojen metyyliestereitä ja se ei sisällä aromaattisia hiilivetyjä (Malkki 2006; Demirbas 2005). Rasvahappojen metyyliestereiden hajottaminen vaatii vain yhden hydrolyyttisen entsymaattisen reaktion ennen kappaleessa 4.1.1 kuvattua yhdisteen pilkkoutumista  $\beta$ -oksidaatiolla. Tyydyttymättömien rasvahappojen hapetus vaatii kaksi lisäreaktiota tyydyttyneiden rasvahappojen hapetukseen verrattuna niissä olevien kaksoissidosten takia. *Cis,trans*-isomeraatioissa kaksoissidoksen *trans*-konfiguraation *cis*-konfiguraatioksi. Epimerisaatioissa yhdisteen D-rakenne muuttuu L-rakenteeksi. Nämä reaktiot muuttavat yhdisteen rakenteen sellaiseksi, että  $\beta$ -oksidaatiosykli on mahdollinen. (Owsianiak et al. 2009; Schleicher et al. 2009; Campbell ja Farrell 2005)

Ympäristön pH:n ollessa 6.0 – 7.0, suurin osa mikro-organismeista voi käyttää pitkäketjuisia (C12-C18) rasvahappoja hiilenlähteenä. Biodiesel on siis hyvä ja energiataloudellisesti parempi hiilenlähde aerobisille mikro-organismeille kuin mineraaliöljypohjainen polttoaine. (Owsianiak et al. 2009; Ratledge 1994)

#### 4.1.3. Uusiutuvista raaka-aineista valmistettu diesel

Uusiutuvista raaka-aineista valmistettu diesel koostuu C12-C26 alkaaneista ja se ei sisällä aromaattisia hiilivetyjä (Neste Oil Oyj 2009). Alkaanien aerobinen ja anaerobinen hajoaminen on kuvattu kappaleessa 4.1.1.

### 4.2. Polttoaineiden mikrobidiversiteetti

Mikrobidiversiteetti voidaan määritellä useilla eri tavoilla. Griffithsin et al. (1997) mukaan diversiteetillä voidaan tarkoittaa lajirunsautta (erilaisten lajien lukumäärää), lajien lukumäärän tasaisuutta (eri lajien yksilöiden suhteellista osuutta koko organismimäärästä) tai lajikoostumusta (eri lajien tyyppejä ja suhteellisia osuuksia). Tässä mikrobidiversiteetillä tarkoitetaan lajirunsautta, joka on määritettävissä tällä hetkellä käytössä olevilla menetelmillä.

#### 4.2.1. Mineraalidiesel ja lentopetroli

Mineraalidieselin ja lentopetrolin mikrobidiversiteettiä on tutkittu paljon. Mineraaliöljypohjaisissa polttoaineissa ja niiden varastoinnissa esiintyneitä mikro-organismeja on esitetty taulukossa 4.1.

**Taulukko 4.1. Mineraaliöljypohjaisissa polttoaineissa ja niiden varastoinnissa esiintyneitä mikro-organismeja (mp = määrittelymäärien polttoaine; bensini, lentopetroli tai diesel)**

Mikro-organismi	Havaintopaikka	Ominaisuudet <sup>(3)</sup>	Lähde
<b>Aerobiset bakteerit</b>			
<i>Acidovorax</i> sp.	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, liikkuvat 1-3 polkaarisen flagellan avulla. Jotkin lajit aiheuttavat kasvitautia. <i>A. facilis</i> ja <i>A. delafieldii</i> voivat kasvaa litotautifisesti.	Denaro et al. 2005
<i>Acinetobacter</i> <sup>(1)</sup> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ** <sup>(1)</sup> , <i>Acinetobacter cerificans</i> ** <sup>(1)</sup> , <i>Acinetobacter iwoffi</i> **	mp, lentopetroli **	Gramnegatiivisia, opportunistisia patogeeneja. Useimmilla lämpötilaoptimi 33-35°C, mutta jotkin kannat eivät kasva yli 37°C:ssä. Kapseloidut solut tuottavat limaa. Eivät muodosta itiöitä.	Rauch et al. 2006; Denaro et al. 2005; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Alcaligenes</i> sp. ** <sup>(1)</sup> , <i>Alcaligenes paraducus</i> **, <i>Alcaligenes xylosonxidans</i> **	mp, lentopetroli **	Gramnegatiivisia, ehdottomia aerobeja. Jotkin kannat pystyvät anaerobirespiraatioon nitriin tai nitraatin avulla. Kemo-organotrofeja. Lämpötilaoptimi 20-37°C.	Rauch et al. 2006; Denaro et al. 2005; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Aquabacterium</i> sp.	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, liikkuvat yhden polkaarisen flagellan avulla. Tuottavat solunulkoisia polysakkarideja. Mikroaerofiliisiä, anaerobirespiraatioissa elektronikseptorina toimii nitraatti. Optimi-pH n. 7 ja optinilämpötila n. 20°C.	Denaro et al. 2005
<i>Aquaspirillum metamorphum</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, liikkuu polkaarisen flagellan avulla. Kemo-organotrofi.	Denaro et al. 2005
<i>Arthrobacter</i> sp. **, <i>Arthrobacter cumminsi</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> <sup>(1)</sup> , <i>Arthrobacter simplex</i> <sup>(1)</sup>	mp, lentopetroli **	Obligaatteja aerobeja, grampositiivisia ja kemo-organotrofeja. Yleisiä maaperäbakteereja. Useat lajit pelkistävät kuusihioksisia kromia ja hajottavat tuholaistorjunta-aineita.	Rodriguez-Rodriguez et al. 2009; Rauch et al. 2006; Denaro et al. 2005; Robbins ja Levy 2004
<i>Bacillus</i> sp. ** ** <sup>(1)</sup> , <i>Bacillus acidocaldarius</i> **, <i>Bacillus anthracis</i> **, <i>Bacillus brevis</i> **, <i>Bacillus carboniphilus</i> **, <i>Bacillus cereus</i> ** **, <i>Bacillus fastidiosus</i> , <i>Bacillus firmus</i> **, <i>Bacillus laevolacticus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> **, <i>Bacillus litoralis</i> **, <i>Bacillus megatherium</i> * **, <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus pumilus</i> * **, <i>Bacillus racemilacticus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ** **, <i>Bacillus thuringiensis</i> **	mp, diesel <sup>(1)</sup> , lentopetroli **	Obligaatteja aerobeja tai fakultatiivisia anaerobeja, grampositiivisia. Monet lajit tuottavat solunulkoisia hydrolyytisiä entsyymejä. Jotkin lajit patogeenisia.	Rajasekar et al. 2010, Itah et al. 2009, Rodriguez-Rodriguez et al. 2009, Balster et al. 2006; Rauch et al. 2006; Denaro et al. 2005; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Blastobacter</i> sp.	Lentopetroli	Jakautuvat kurotutuma. Jotkin lajit liikkuvat flagelloiden avulla. Aerobeja ja heterotrofeja. Kasvavat 10-46°C lämpötilassa. Optimi-pH 6.8-7.8.	Denaro et al. 2005
<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, aerobeja ja kemo-organotrofeja. Liikkuvat yhden polkaarisen tai subpolkaarisen flagellan avulla. Optimi-pH 6-7 ja optinilämpötila 25-30°C. Jotkin lajit sitovat typpeä.	Denaro et al. 2005
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> **, <i>Brevibacterium mcbrenneri</i>	mp, lentopetroli **	Grampositiivisia. Yleisiä maaperäbakteereita. Obligaatteja aerobeja ja kemo-organotrofeja. Kasvavat 8% natriumkloridipitoisuudessa.	Rodriguez-Rodriguez et al. 2009; Rauch et al. 2006; Gaylarde et al. 1999
<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, aerobi, ei muodosta itiöitä. Kemo-organotrofinen ja oligotrofinen.	Denaro et al. 2005
<i>Burkholderia</i> sp., <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Burkholderia glathei</i> , <i>Burkholderia xenovorans</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, kemo-organotrofeja. Aerobia, jotkin lajit pystyvät anaerobirespiraatioon nitraatin avulla. Jotkin lajit sitovat typpeä. Liikkuu yhden tai useamman polkaarisen flagellan avulla.	Denaro et al. 2005
<i>Caulobacter subvibrioides</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, ehdoton aerobi. Kemo-organotrofi ja oligotrofi. Liikkuu yhden flagellan avulla. Sietää 10-35°C lämpötilaa ja 6-9 pH:ta.	Denaro et al. 2005

### Taulukko 4.1. jatkuu

Mikro-organismit	Havaintopaikka	Ominaisuudet <sup>1,3</sup>	Lähde
<b>Aerobiset bakteerit</b>			
<i>Caulobacteraceae bacterium</i>	Lentopetroli	<i>Caulobacter</i> , <i>Asiccaculis</i> , <i>Brevundimonas</i> ja <i>Phenyllobacterium</i> suvun bakteerit. Ehdottomasti aerobeja. Kemo-organotrofeja ja oligotrofeja.	Denaro et al. 2005
<i>Clavibacter michiganensis</i> ss. <i>insidiosus</i>	mp	Aerobi, grampositiivinen. Kasvipatogeeni.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009
<i>Curtobacterium</i> sp.	Lentopetroli	Grampositiivisia, liikkuvat yleensä väreksävaisten flagelloiden avulla. Eivät muodosta itiöitä. Ehdottomia aerobeja, kemo-organotrofeja. Lämpötilaoptimi 25-30°C.	Denaro et al. 2005
<i>Deinococcus radiodurans</i>	mp	Grampositiivinen, aerobi, kemo-organotrofi. Ei liku, eikä muodosta itiöitä. Kestää erityisen hyvin ionisoivaa säteilyä, kuivuutta ja ultraviolettisäteilyä.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009
<i>Dermacoccus nishinomyaensis</i>	mp	Gramnegatiivinen, aerobi.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009
<i>Diaphorobacter nitroreducens</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, liikkuu yhden polaarisen flagellan avulla. Kasvaa aerobisesti ja anaerobisesti. Dentritifoi.	Denaro et al. 2005
<i>Dierzia</i> sp.	Lentopetroli	Grampositiivisia, aerobeja. Eivät muodosta itiöitä. Kemo-organotrofeja.	Rauch et al. 2006
<i>Escherichia</i> sp., <i>Escherichia coli</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, aerobeja ja fakultatiivisia aerobeja. Kemo-organotrofeja.	Rauch et al. 2006; Denaro et al. 2005
<i>Flavobacterium arborescens</i> **, <i>Flavobacterium adoretum</i> **, <i>Flavobacterium diffusum</i> **	mp, lentopetroli**	Gramnegatiivisia, aerobeja. Eivät liku, eivätä muodosta itiöitä. Kemo-organotrofeja.	Itah et al. 2009, Rauch et al. 2006; Gaylarde et al. 1999
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, aerobi. Esiintyy yleensä rihmamaissessa solumuodossa. Kemo-organotrofi. Lämpötilaoptimi 35-37°C.	Denaro et al. 2005
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, liikkuu 1-2 unipolaarisen flagellan avulla. Sitoo tyyppiä mikrobisymbiosissa olosuhteissa. Lämpötilaoptimi 30-37°C ja optimi-pH 6,0-7,0.	Denaro et al. 2005
<i>Kocuria kristinae</i> , <i>Kocuria rhizophila</i> **, <i>Kocuria rosea</i> , <i>Kocuria varians</i>	mp, lentopetroli**	Grampositiivisia, kemo-organotrofeja. Eivät muodosta itiöitä. Aerobeja.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009; Rauch et al. 2006
<i>Kurtzia gibsonii</i>	mp	Grampositiivinen, aerobi. Lämpötilaoptimi 25-30°C.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009
<i>Kytococcus sedentarius</i>	mp	Grampositiivinen, kemo-organotrofi. Ei liku, eikä muodosta itiöitä. Aerobi, lämpötilaoptimi 28-36°C. Kasvavat hyvin alle 10% natriumkloridipitoisuudessa.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009
<i>Leucobacter komagatae</i>	Lentopetroli	Grampositiivinen, aerobi. Ei liku, eikä muodosta itiöitä.	Rauch et al. 2006
<i>Methylobacterium</i> sp.	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, fakultatiivisia metylootrofeja. Liikkuvat yhden flagellan avulla. Aerobeja, mesofilejä, kemo-organotrofeja.	Bakster et al. 2006; Denaro et al. 2005
<i>Microbacterium</i> sp. **, <i>Microbacterium maritropicum</i> , <i>Microbacterium oleovorans</i> **, <i>Microbacterium saperdiae</i>	mp, lentopetroli**	Grampositiivisia, eivät muodosta itiöitä. Aerobeja, kemo-organotrofeja. Lämpötilaoptimi 30°C.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009; Denaro et al. 2005
<i>Micrococcus</i> sp. **, <i>Micrococcus luteus</i> **, <i>Micrococcus lylae</i> , <i>Micrococcus varians</i> **	mp, lentopetroli**	Grampositiivisia, yleensä ehdottomia aerobeja. Eivät yleensä liku, eivätä muodosta itiöitä.	Itah et al. 2009, Rodríguez-Rodríguez et al. 2009; Rauch et al. 2006; Gaylarde et al. 1999
<i>Moraxella</i> sp.	mp	Gramnegatiivisia. Eivät liku, eivätä muodosta itiöitä. Psykrotootrofeja tai mesofilejä. Aerobeja, kemo-organotrofeja.	Gaylarde et al. 1999
<i>Mycobacterium</i> sp. **, <i>Mycobacterium mucogenicum</i> **, <i>Mycobacterium smegmatis</i> <sup>(1)</sup>	mp, lentopetroli**	Aerobeja, eivät liku. Grampositiivisia, eivät muodosta itiöitä. Jotkin lajit patogeenisiä.	Denaro et al. 2005; Robbins ja Levy 2004
<i>Nocardia petroleophila</i> <sup>(1)</sup>	mp	Grampositiivinen. Muodostaa haarautuvia filamentteja. Ehdoton aerobi.	Robbins ja Levy 2004



### Taulukko 4.1. jatkuu

Mikro-organismit	Havaintopaikka	Ominaisuudet <sup>1,3</sup>	Lähde
<b>Aerobiset bakteerit</b>			
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	mp	Gramnegatiivinen, ehdoton aerobi. Liikkuu värekarvaisen flagellan avulla.	Gaylarde et al. 1999
<i>Pandoraea</i> sp.	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, eivät muodosta itiöitä. Liikkuvat yhden polaarisen flagellan avulla. Aerobeja.	Denaro et al. 2005
<i>Pasteurella</i> sp.	mp	Gramnegatiivinen, ei liiku. Ei muodosta itiöitä. Joskus muodostaa filamentteja. Aerobeja, mikroaerofilejä tai fakultatiivisia anaerobeja. Kemo-organotrofeja. Lämpötilaoptimi 35-37°C.	Gaylarde et al. 1999
<i>Phyllobacterium</i> sp., <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, ehdottomia aerobeja. Lämpötilaoptimi 28-34°C. Kemo-organotrofeja.	Denaro et al. 2005
<i>Pseudomonas</i> sp. <sup>***</sup> ( <sup>1</sup> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> *, <sup>***</sup> ( <sup>1</sup> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>(1)</sup> , <i>Pseudomonas gladioli</i> **, <i>Pseudomonas maliphora</i> , <i>Pseudomonas oleovorans</i> <sup>(1)</sup> , <i>Pseudomonas putida</i> <sup>(1)</sup> , <i>Pseudomonas veronii</i> **, <i>Pseudomonas stutzeri</i> *	mp, diesel*, lentopetroli**	Gramnegatiivisia. Liikkuvat yhden tai useamman polaarisen flagellan avulla. Aerobeja. Jotkin lajit voivat käyttää vaihtoehtoisena elektroniakseptorina. Eivät kasva alle 4,5 pH:ssa. Jotkin lajit patogeeneja.	Rajasekar et al. 2010, Itah et al. 2009, Balster et al. 2006; Rauch et al. 2006; Denaro et al. 2005; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Ralstonia eutropha</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, ei muodosta itiöitä. Aerobi, fakultatiivinen kemoliaoautotrofi. Anaerobisissa olosuhteissa käyttää nitraattia elektroniakseptorina.	Balster et al. 2006
<i>Rhizobium</i> sp.	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, eivät muodosta itiöitä. Aerobeja, kemo-organotrofeja. Lämpötilaoptimi 25-30°C, optimi-pH 6,0-7,0. Toimivat kasvien juurissa endofyytteinä.	Denaro et al. 2005
<i>Rhodococcus</i> sp. <sup>**</sup> ( <sup>1</sup> , <i>Rhodococcus equi</i> **, <i>Rhodococcus erythropolis</i> **, <i>Rhodococcus fasciens</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> **	mp, lentopetroli**	Grampositiivisia, aerobeja rinnabakteereja. Eivät liiku, eivät muodosta itiöitä. Mesofilejä ja psykrofilejä. Hajottavat monenlaisia orgaanisia yhdisteitä, poistavat biologisesti rikkiä fossiilista polttoaineista.	Rodriguez-Rodriguez et al. 2009; Balster et al. 2006; Denaro et al. 2005; Robbins ja Levy 2004
<i>Sarcina flava</i>	Lentopetroli	Grampositiivinen, ei liiku. Aerobi.	Itah et al. 2009
<i>Sphingomonas</i> sp., <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, eivät muodosta itiöitä. Aerobeja, jotkin lajit opportunistisia patogeeneja. <i>S. yanoikuyae</i> hajottaa aromaattisia hiilivetyjä.	Balster et al. 2006; Rauch et al. 2006; Denaro et al. 2005
<i>Streptomyces</i> sp.	Lentopetroli	Grampositiivisia, tuottavat itiöitä. pH-alue 5,0-11,5. Kemo-organotrofeja, aerobeja. Monet kannat tuottavat antibiootteja. Kasvavat sienien kalaisesti.	Rauch et al. 2006
<i>Tsukamurella inehonensis</i>	mp	Grampositiivinen, ei muodosta itiöitä. Ehdoton aerobi, ei liiku. Kemo-organotrofi.	Rodriguez-Rodriguez et al. 2009
<i>Variovorax</i> sp.	Lentopetroli	Gramnegatiivisia. Liikkuvat värekarvaisen flagellan avulla. Aerobeja. Kemo-organotrofeja, jotkin lajit lioautotrofeja.	Denaro et al. 2005
<b>Anaerobiset bakteerit</b>			
<i>Actinomyces</i> , <i>Actinomyces hordeovulneris</i>	mp	Grampositiivisia, monet opportunistisia patogeeneja. Anaerobeja tai fakultatiivisia anaerobeja. Pesäkkeet muodostavat seinäisiä rihmoja. Eivät muodosta itiöitä.	Rodriguez-Rodriguez et al. 2009; Gaylarde et al. 1999
<i>Aerobacter aerogenes</i> ( <i>Enterobacter aerogenes</i> )**	mp, lentopetroli**	Gramnegatiivinen, opportunistinen patogeeni. Fakultatiivinen anaerobi. Liikkuu solua ympäröivien flagelloidien avulla.	Rauch et al. 2006; Gaylarde et al. 1999
<i>Aeromonas</i> sp.	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, fakultatiivisia anaerobeja ja kemo-organotrofeja. Lämpötilaoptimi 22-37°C, mutta jotkin kannat eivät kasva yll 35°C:ssa. Jotkin lajit patogeeneja.	Rauch et al. 2006
<i>Brochothrix campestris</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i>	mp	Grampositiivisia, fakultatiivisia anaerobeja. Eivät liiku ja eivät muodosta itiöitä.	Rodriguez-Rodriguez et al. 2009

### Taulukko 4.1. jatkuu

Mikro-organismi	Havaintopaikka	Ominaisuudet <sup>3</sup>	Lähde
<b>Anaerobiset bakteerit</b>			
<i>Cellulomonas gelida</i>	mp	Fakultatiivinen anaerobi, grampositiivinen. Liikkuu usein yhden tai useamman flagellan avulla. Kemo-organotrofi. Ei muodosta itiöitä.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009
<i>Clostridium intestinale</i> ** <sup>1</sup> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Clostridium sporosphaeroides</i> **	mp, lentopetroli**	Grampositiivisia, anaerobeja. Muodostavat itiöitä ja toksineja.	Bakster et al. 2006; Denaro et al. 2005; Gaylarde et al. 1999
<i>Corynebacterium</i> sp., <i>Corynebacterium glutamicum</i> <sup>1</sup> , <i>Corynebacterium nitrophilus</i>	mp	Grampositiivisia, eivät liiku, eivätkä muodosta itiöitä. Fakultatiivisia anaerobeja, kemo-organotrofeja. Nisäkkäiden loisia, jotkin lajit patogeenisiä.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Enterobacter cloacae</i> ** <sup>1</sup> , <i>Enterobacter agglomerans</i> **	mp, lentopetroli**	Gramnegatiivisia, fakultatiivisia anaerobeja. Pelkistävät nitraatin nitriiksi. Lämpötilaoptimi 30°C. Patogeenisiä.	Rauch et al. 2006; Gaylarde et al. 1999
<i>Ewingella americana</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, fakultatiivinen anaerobi.	Denaro et al. 2005
<i>Globicatella sanguinis</i>	mp	Grampositiivinen, fakultatiivinen anaerobi.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009
<i>Granulicatella</i> sp.	Lentopetroli	Grampositiivisia. Eivät liiku, eivätkä muodosta itiöitä. Fakultatiivisia anaerobeja. Eivät kasva alle 10°C tai yli 45°C.	Denaro et al. 2005
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Diesel	Gramnegatiivinen, fakultatiivinen anaerobi. Ei liiku, muodostaa linua. Sitoo typpeä.	Rajasekar et al. 2010
<i>Lactococcus lactis</i>	Lentopetroli	Grampositiivinen. Ei liiku, eikä muodosta itiöitä. Kemo-organotrofi, fakultatiivinen anaerobi.	Denaro et al. 2005
<i>Paenibacillus macerans</i>	mp	Grampositiivinen, fakultatiivinen anaerobi. Muodostaa itiöitä.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009
<i>Pantoea ananatis</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, ei muodosta itiöitä. Fakultatiivinen anaerobi.	Rauch et al. 2006
<i>Photorhabdus luminescens</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, fakultatiivinen anaerobi. Liikkuu värekarvaisen flagellan avulla. Tuottaa valoa.	Denaro et al. 2005
<i>Propionibacterium acnes</i>	Lentopetroli	Grampositiivinen, kemo-organotrofi. Ei liiku, eikä muodosta itiöitä. Fakultatiivinen anaerobi, mutta aerotolerantti.	Denaro et al. 2005
<i>Rahnella</i> sp., <i>Rahnella aquatilis</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivisia, fakultatiivisia anaerobeja. Kemo-organotrofeja, psykrotolerantteja.	Denaro et al. 2005
<i>Rothia amarae</i> , <i>Rothia mucilaginosa</i>	Lentopetroli	Grampositiivisia, eivät liiku. Eivät muodosta itiöitä. Fakultatiivisia anaerobeja.	Denaro et al. 2005
<i>Serratia marcescens</i> * ** <sup>1</sup> , <i>Serratia odorifera</i> **	mp, diesel*, lentopetroli**	Gramnegatiivisia, fakultatiivisia anaerobeja. <i>S. odorifera</i> on harvinainen opportunistinen patogeeni.	Rajasekar et al. 2010, Rauch et al. 2006; Gaylarde et al. 1999
<i>Staphylococcus</i> sp. **, <i>Staphylococcus arlettae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Staphylococcus warneri</i>	mp, lentopetroli**	Grampositiivisia, eivät liiku. Fakultatiivisia anaerobeja. Eivät muodosta itiöitä. Jotkin lajit opportunistisia patogeenisiä.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009; Rauch et al. 2006; Denaro et al. 2005
<i>Streptococcus</i> sp. **, <i>Streptococcus mitis</i> **, <i>Streptococcus infantis</i> **, <i>Streptococcus intestinalis</i>	mp, lentopetroli**	Grampositiivisia. Jotkin lajit patogeenisiä. Fakultatiivisia anaerobeja.	Rodríguez-Rodríguez et al. 2009; Denaro et al. 2005
Sulfattia pelkistävät bakteerit*, <i>Desulfovibrio</i> sp. **, <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <sup>1</sup>	mp, diesel*, lentopetroli**	Gramnegatiivisia, eivät muodosta itiöitä. Ehdottomia anaerobeja, pelkistävät sulfattia. Lämpötilaoptimi 25-35°C. Kemo-organotrofeja, jotkin lajit sitovat typpeä.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999

### Taulukko 4.1. jatkuu

Mikro-organismi	Havaintopaikka	Ominaisuudet <sup>3</sup>	Lähde
<b>Anaerobiset bakteerit</b>			
<i>Wolinella succinogenes</i>	Lentopetroli	Gramnegatiivinen, ei muodosta itiöitä. Anaerobi, liukkuu polaarisen flagellan avulla.	Denaro et al. 2005
<b>Hiivat</b>			
<i>Aureobasidium pullulans</i> **	mp, lentopetroli**	Pesäkkeet kasvavat nopeasti ja ovat ilmaisten itiöiden peittämiä. Rihmat ovat läpinäkyviä ja väliseinäisiä. Lämpötila-alue 2-35°C, optimi 25°C.	Rauch et al. 2006; Gaylarde et al. 1999
<i>Candida</i> sp. *** <sup>(1)</sup> , <i>Candida albicans</i> **, <i>Candida fluvialis</i> , <i>Candida fumata</i> ** <sup>(1)</sup> , <i>Candida guilliermondii</i> <sup>(1)</sup> , <i>Candida lipolytica</i> ** <sup>(1)</sup> , <i>Candida rugosa</i> <sup>(1)</sup> , <i>Candida silvicola</i> * <sup>(1)</sup> , <i>Candida tropicalis</i> ** <sup>(1)</sup> , <i>Candida zeylanoides</i>	mp, diesel*, lentopetroli**	Itiöt lisääntyvät monikeskisesti kuroutumalla. Muodostavat usein pseudorihmoja. Monet lajit nsäkkäiden endosymbionteja. Jotkin lajit taudinaiheuttajia.	Itah et al. 2009, Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Exophiala jeanselmei</i>	Lentopetroli	Itiöt ovat läpinäkyviä, sileitä, ohuseinäisiä ja soikeita. Kasvaa 37°C lämpötilassa, mutta ei yli 40°C. Patogeeni.	Rauch et al. 2006
<i>Hansenula mirabilis</i>	mp	Tuottaa toksinia, joka estää <i>Saccharomyces cerevisiae</i> n soluseinän synteesin.	Gaylarde et al. 1999
<i>Rhodotorula</i> sp. ** <sup>(1)</sup> , <i>Rhodotorula glutinis</i> *	mp, diesel*, lentopetroli**	Lisääntyvät polaarisesti tai monikeskisesti kuroutumalla. Voivat muodostaa todellisia tai pseudorihmoja.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Saccharomyces</i> sp., <i>Saccharomyces estuari</i> **, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	mp, lentopetroli**	Lisääntyvät monikeskisesti kuroutumalla. Voivat muodostaa pseudorihmoja. Monia lajeja käytetään ruuan valmistuksessa.	Itah et al. 2009, Gaylarde et al. 1999
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Lentopetroli	Jakautuu kasvamalla solun päistä ja muodostaa kaksi sarankokoista tytärsolua.	Itah et al. 2009
<i>Torulopsis colliculosa</i> <sup>(1)</sup>	mp	Muodostaa pyöreitä tai soikeita kuroutuvia itiöitä.	Robbins ja Levy 2004
<i>Yarrowia tropicalis</i> <sup>(1)</sup>	mp	Muodostaa haarautuvia pseudorihmoja, joista itiöt kuroutuvat. Patogeeni.	Robbins ja Levy 2004
<b>Homeet</b>			
<i>Acremonium</i> sp. ** <sup>(1)</sup> , <i>Acremonium strictum</i> ** <sup>(1)</sup>	mp, lentopetroli**	Pesäkkeet kasvavat hitaasti. Rihmat ovat ohuita ja läpinäkyviä. Jotkin lajit opportunistisia patogeneja.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Alternaria</i> sp. *, <i>Alternaria alternata</i> *	mp, diesel*	Pesäkkeet kasvavat nopeasti. Lyhyet tai pidentyneet, joskus haarauneet itiörihmat tuottavat moniseinäisiä itiöitä. Monet lajit kasvilaisia.	Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Aspergillus</i> sp. ** <sup>(1)</sup> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Aspergillus fischeri</i> , <i>Aspergillus flavus</i> *** <sup>(1)</sup> , <i>Aspergillus fumigatus</i> *** <sup>(1)</sup> , <i>Aspergillus niger</i> *** <sup>(1)</sup> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus paradoxus</i> , <i>Aspergillus sejunctus</i> <sup>(2)</sup> , <i>Aspergillus sydowii</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus tanarii</i>	mp, diesel*, lentopetroli**	Pesäkkeet kasvavat nopeasti. Pesäkkeet koostuvat pääasiassa paksumista itiörihmatosta. Itiöt ovat yksiseinäisiä, sileitä tai karheita, läpinäkyviä tai värillisiä.	Itah et al. 2009, Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Botrytis cinerea</i>	mp	Nekrotri. Harnaat, haarautuvat itiörihmat tuottavat runsaasti läpinäkyviä itiöitä.	Gaylarde et al. 1999
<i>Cephalosporium</i> sp., <i>Cephalosporium roseum</i> <sup>(1)</sup>	mp	Kasvipatogeneja.	Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Chaetomium dolichotrichum</i> , <i>Chaetomium globosum</i>	mp	Saprofyttejä. Useat lajit termofiilejä ja kasvavat yli 37°C lämpötilassa.	Gaylarde et al. 1999
<i>Cladosporium</i> sp. **, <i>Cladosporium cladosporioides</i> <sup>(1)</sup> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Cladosporium resinae</i> **, <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	mp, lentopetroli**	Pesäkkeet kasvavat hitaasti. Kulkeutuu ilman mukana.	Itah et al. 2009, Balster et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999

### Taulukko 4.1. jatkuu

Mikro-organismi	Havaintopaikka	Ominaisuudet <sup>1,3</sup>	Lähde
<b>Homeet</b>			
<i>Cochliobolus lunatus</i>	Diesel	Kasvipatogeeni.	Bento ja Gaylarde 2001
<i>Curvularia lunata</i>	mp	Pesäkkeet samettimaisen mustia ja pörröisiä. Kasviloinen, voi aiheuttaa infektoita ihmisellä.	Gaylarde et al. 1999
<i>Cylindrocarpus</i> sp.	Lentopetroli	Monet lajit kasvipatogeeniä. Jotkin lajit satumaisesti eläin- ja ihmispatogeeniä.	Balster et al. 2006
<i>Discophaeria fagi</i>	Lentopetroli	Esiintyy maaperässä.	Rauch et al. 2006
<i>Drechslera cynodontis</i>	mp	Kasvipatogeeni.	Gaylarde et al. 1999
<i>Epicoccum purpurascens</i>	mp	Pesäkkeet kasvavat nopeasti. Saprofytti.	Gaylarde et al. 1999
<i>Fusarium</i> sp. <sup>**1</sup> , <i>Fusarium acuminatum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> <sup>**1</sup> , <i>Fusarium oxysporum</i> <sup>1</sup> , <i>Fusarium sambucinum</i>	mp, lentopetroli <sup>**</sup>	Kasvipatogeeniä. Jotkin lajit tuottavat sienimyrkkyjä.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Geomyces cretaceus</i>	mp	Psyktolerantti.	Gaylarde et al. 1999
<i>Geotrichum candidum</i>	mp	Aiheuttaa keuhkotulehduksen. Muodostaa läpinäkyviä, sileitä, yksiseinäisiä, ilmaisia itiöitä.	Gaylarde et al. 1999
<i>Glomastix</i> sp.	mp	Muodostavat tummia itiöitä. Rustomaiset rihmat.	Gaylarde et al. 1999
<i>Helminthosporium</i> sp. <sup>**</sup>	mp, lentopetroli <sup>**</sup>	Pesäkkeet kasvavat nopeasti. Muodostaa erillisiä rihmoja. Itiöt ovat monisoluisia ja isoja.	Rauch et al. 2006; Gaylarde et al. 1999
<i>Hormoconis resinae</i> <sup>***1</sup>	mp, diesel <sup>**</sup> , lentopetroli <sup>**</sup>	Pystyy käyttämään polttoaineen hiilivetyjä kasvuunsa ja selviytymään korkealle lentokorkeuksille tyypillisissä, hyvin matalissa lämpötiloissa.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Humicola grisea</i>	mp	Termofiili, hajottaa selluloosaa.	Gaylarde et al. 1999
<i>Mucor</i> sp. <sup>1</sup>	mp	Pesäkkeet kasvavat nopeasti. Pesäkkeet ovat pumpulinmaisista tai pörröisiä, valkoisia tai keltaisia. Jotkin lajit termotolerantteja.	Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Paecilomyces</i> sp. <sup>**1</sup> , <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> <sup>***1</sup> , <i>Paecilomyces virgatus</i>	mp, diesel <sup>**</sup> , lentopetroli <sup>**</sup>	Pesäkkeet kasvavat nopeasti. Pesäkkeet ovat puuterimaisia tai nahkamaisia. Jotkin lajit aiheuttavat sarveiskalvotulehduksia henkilöille, joilla on alhainen immuunivaste.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Penicillium</i> sp. <sup>**1</sup> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium canescens</i> , <i>Penicillium citrinum</i> <sup>***</sup> , <i>Penicillium corylophilum</i> <sup>**1</sup> , <i>Penicillium cyclopium</i> <sup>1,2</sup> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium echinulatum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium frequentans</i> <sup>**2</sup> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Penicillium glabrum</i> <sup>2</sup> , <i>Penicillium hirsutum</i> , <i>Penicillium minioluteum</i> , <i>Penicillium notatum</i> <sup>2</sup> , <i>Penicillium spinulosum</i> , <i>Penicillium thomii</i> , <i>Penicillium waksmanii</i>	mp, diesel <sup>**</sup> , lentopetroli <sup>**</sup>	Pesäkkeet kasvavat nopeasti. Pesäkkeet koostuvat pääasiassa paksusta itiöriihmamatosta. Monet lajit tuottavat sienimyrkkyjä.	Itah et al. 2009, Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Bento ja Gaylarde 2001; Gaylarde et al. 1999
<i>Pestalotiopsis aquatica</i>	mp	Kasvipatogeeni.	Gaylarde et al. 1999
<i>Phialophora</i> sp. <sup>**1</sup> , <i>Phialophora richardsiae</i>	mp, lentopetroli <sup>**</sup>	Pesäkkeet kasvavat nopeasti ja ovat harmaita tai olivinvärisiä. Monet lajit saprofyttisiä.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999

### Taulukko 4.1. jatkuu

Mikro-organismi	Havaintopaikka	Ominaisuudet <sup>1,3</sup>	Lähde
<b>Homeet</b>			
<i>Phoma</i> sp.	mp	Monet lajit kasvipatogeenisiä. Itiöt ovat väriltömiä ja yksisoluisia.	Gaylarde et al. 1999
<i>Phomopsis</i> sp.	mp	Kasvipatogeenisiä.	Gaylarde et al. 1999
<i>Pseudallescheria boydii</i>	mp	Alheuttaa kroonisia sieni-infektioita ja sienitulehduksia.	Gaylarde et al. 1999
<i>Rhinocladiella</i> sp. <sup>*(1)</sup>	mp, lentopetrol <sup>**</sup>	Pesäkkeet kasvavat hilaasti ja ovat samettisia. Rihmat ovat erillisii ja ruskeita.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Rhizopus oryzae</i>	mp	Opportunistinen patogeeni.	Gaylarde et al. 1999
<i>Sordaria fimicola</i>	mp	Lyhyt elinikä (< 12 päivää). Fototrofinen. Pesäkkeet yleensä tumman ruskeita.	Gaylarde et al. 1999
<i>Stemphylium botryosum</i>	mp	Kasvipatogeeni, saprofyytti.	Gaylarde et al. 1999
<i>Thielavia</i> sp.	mp	Alheuttaa juurimätää.	Gaylarde et al. 1999
<i>Trichoderma</i> sp., <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Trichoderma viride</i> <sup>(1)</sup>	mp	Kasvavat parhaiten 25-30°C, mutta ei yli 35°C lämpötilassa. Kasvavat yksisesti maaperässä.	Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Trichosporon</i> sp. <sup>** (1)</sup>	mp, lentopetrol <sup>**</sup>	Anamorfisia. Kasvavat yleensä maaperässä, mutta useita lajeja esiintyy ihmisen ihon normaalissa mikrobiotasssa.	Rauch et al. 2006; Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999
<i>Trichothecium roseum</i>	mp	Ajoittain saprofyytti. Itiöt ovat kaksisoluisia, läpinäkyviä, soikeita tai päärynämuotoisia.	Gaylarde et al. 1999
<i>Tritirachium oryzae</i>	mp	Itiöt läpinäkyviä, sileitä, ohutseinäisiä, pallonmuotoisia tai soikeita.	Gaylarde et al. 1999
<i>Ulocladium</i> sp. <sup>**</sup> , <i>Ulocladium atrum</i> , <i>Ulocladium chartarum</i>	mp, lentopetrol <sup>**</sup>	Kasvipatogeenisiä ja ruokaa pilaaavia homeita. Monet lajit saprofyyttejä ja kasvavat maaperässä.	Balster et al. 2006; Gaylarde et al. 1999

1) Organismilla kyky käyttää polttoainetta hienlähteinä.

2) Synonyymit: *Aspergillus sejunctus* = *A. rubrobrunneus*, *Penicillium frequentans* = *P. glabrum*, *P. cylloptum* = *P. aurantiogriseum*, *P. notatum* = *P. chrysogenum*.

3) Ellis 2011; Collins 2006; Madigan ja Martinko 2006; McLeod et al. 2006; Garrity et al. 1999; Gaylarde et al. 1998; Kurtzman ja Fell 1998; Lopes ja Gaylarde 1996; Euzéby 1997; Holt 1994

#### 4.2.2. Biodiesel (FAME)

Biodieselpolttoaineissa esiintyneistä mikro-organismeista ei tällä hetkellä ole saatavilla julkaistua tietoa. Rasvahappojen hyväksikäyttö on kuitenkin hyvin yleinen aerobisten mikro-organismien aineenvaihdunnallinen ominaisuus. Rasvahappoja käyttäviä mikro-organismeja on tutkittu paljon ja esimerkiksi Vuillemin et al. (1981) löysivät 857 mikro-organismia, jotka käyttivät C10-C18 rasvahappoja hiilenlähteenä. (Ratledge 1994) Todennäköisesti biodieselissä esiintyvien mikro-organismien diversiteetti on suurempi kuin mineraaliöljypohjaisissa polttoaineissa esiintyvien mikro-organismien.

#### 4.3. Haitallisimmat mikrobit

Rihmasienet ja solun ulkoisia polysakkarideja muodostavat bakteerit aiheuttavat tukkeutumisoongelmia putkissa, venttiileissä, suodattimissa ja vedenpoistopisteissä sekä aiheuttavat mitta-antureiden vääriä arvoja biofilmin muodostumisen seurauksena (Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999). *Hormoconis resinæ* voi olla merkittävä ongelma lentopetroliisäiliössä, erityisesti alumiiniseoksista valmistetuissa säiliöissä aiheuttaen korroosiota sekä pinnoitteiden kulumista ja rikkoutumista. *H. resinæ* pystyy käyttämään polttoaineen hiilivetyjä kasvuunsa ja pystyy selviytymään korkeille lentokorkeuksille tyypillisissä, hyvin matalissa lämpötiloissa. (Gaylarde et al. 1999; Lopes ja Gaylarde 1996) Polttoainesäiliöiden korroosioon vaikuttavat eniten anaerobiset sulfaattia pelkistävät bakteerit, jotka tuottavat myös myrkyllistä rikkivetykaasua (Gaylarde et al. 1999). Muutaman ppm:n rikkivetypitoisuus vedessä voi vastata tappavaa rikkivetypitoisuutta (> 700 ppm) ilmassa. Rikkivety voi olla hyvin ärsyttävää 100 – 300 ppm pitoisuudessa ja aiheuttaa huimausta 300 ppm pitoisuudessa. (Robbins ja Levy 2004) Erittäin patogeenisten mikrobien esiintyminen polttoaineissa on hyvin epätodennäköistä (Passman 2003). Mikrobikontaminaation vaikutuksia polttoaineiden laatuun ja niiden varastoitavuuteen on kuvattu tarkemmin kappaleessa 5.3.

## 5. POLTTOAINEIDEN MIKROBIOLOGINEN KONTAMINAATIO

### 5.1. Kontaminaation alkuperä ja leviäminen jakelussa

Polttoaineita hiilen ja energian lähteenään käyttäviä mikro-organismeja esiintyy käytännössä kaikkialla: ilmassa, vedessä ja maaperässä. Pilaantumattomassa maaperässä on arvioitu olevan 100 – 1000 hiilivetyjä hapettavaa mikrobia/1 g maata. (Yemashova et al. 2007) Mikro-organismit pääsevät polttoaineisiin usein eri tavoin, muun muassa tuuletus- ja pumppausjärjestelmien kautta, likaantuneen pesuveden mukana ja säiliöiden seinämissä kasvavista biofilmeistä (Yemashova et al. 2007; Gaylarde et al. 1999).

Bakteerit ja hiivat ovat yleensä ensimmäisiä havaittavia organismeja polttoainejärjestelmissä. Niiden kasvun seurauksena muodostuu homeille sopiva kasvuympäristö, jossa on molekyylipainoltaan pienempiä rasvahappoja ja matalampi pH. Biomassan kasvaessa riittävän suureksi muodostuu anaerobisia mikroympäristöjä, jonka seurauksena anaerobisten sulfaattia pelkistävien bakteerien kasvu mahdollistuu. (Bento ja Gaylarde 2001)

### 5.2. Polttoaineiden varastointi ja jakelu mikrobien kasvuympäristönä

#### 5.2.1. Fysikaaliset ja kemialliset olosuhteet varastoinnissa

Mikrobien kasvuun vaikuttavat useat fysikaaliset ja kemialliset tekijät, kuten happipitoisuus, hapetus-pelkistys-potentiaali, veden saatavuus, lämpötila, pH, ravinteiden saatavuus, osmoottinen paine ja suolapitoisuus (Passman 2003). Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi on esitetty kappaleessa 4.1.

#### *Happipitoisuus*

Mikrobien hapentarve ja -sieto vaihtelevat ja ne voidaan jakaa tämän mukaan eri ryhmiin. Ehdottomat aerobit vaativat happea, kun taas fakultatiiviset aerobit eivät vaadi happea, mutta kasvavat paremmin hapellisissa olosuhteissa. Mikroaerofiiliset mikrobit kasvavat parhaiten pienessä happipitoisuudessa. Anaerobiset mikrobit eivät pysty aerobiseen respiraatioon, vaan ne käyttävät muita energiantuottomenetelmiä. Aerotolerantit anaerobit sietävät happea, mutta hapelliset olosuhteet eivät vaikuta niiden kasvuun. Ehdottomat anaerobit vahingoittuvat tai kuolevat hapellisissa olosuhteissa. (Madigan ja Martinko 2006; Passman 2003)

Lentopetroolissa voi olla yli 300 ppm liennuttua happea (Robbins ja Levy 2004). Biodieselin happipitoisuus on noin 11 paino-%. Mineraaliöljypohjaisessa dieselissä ei ole happea liuenneena. (Neste Oil Oyj 2009) Happi voi diffundoitua melko helposti hiilivetytymppohjaisen polttoaineen läpi vesifaasiin (Allsopp et al. 2004). Hapen liukoisuus puhtaaseen veteen on 25°C lämpötilassa on 8.24 mg/l (Metcalf & Eddy 1991, s. 1258) ja kaasujen liukoisuus veteen pienenee lämpötilan kohotessa (Laitinen ja Toivonen 1991). Happipitoisuuden muutos sekoittumattoman kontaminoituneen polttoaineen varastosäiliön vesifaasissa on esitetty kuvassa 5.1 (s. 36).

### ***Hapetus-pelkistys-potentiaali***

Monet entsymaattiset reaktiot ovat hapetus-pelkistys-reaktioita, joissa yksi yhdiste hapettuu ja toinen pelkistyy. Organismien kyky hapetus-pelkistys-reaktioihin riippuu ympäristön hapetus-pelkistys-potentiaalista ( $E_h$ ). Ehdottomat aerobit voivat olla metabolisesti aktiivisia ainoastaan  $E_h$ -potentiaalin ollessa positiivinen ja ehdottomat anaerobit ainoastaan  $E_h$ -potentiaalin ollessa negatiivinen. Fakultatiiviset aerobit voivat toimia laajalla  $E_h$ -potentiaali-alueella ja voivat käyttää sekä happea että vaihtoehtoisia elektroniakseptoreita. (Atlas ja Bartha 1998)

Hapen läsnäolo vaikuttaa merkittävästi  $E_h$ -potentiaaliin. Ilmakehän  $E_h$ -potentiaali on +800 mV ja hapellisten vesien noin 400 – 500 mV. Hapettomassa maaperässä ja sedimenteissä  $E_h$ -potentiaali on negatiivinen, runsaasti orgaanista ainetta sisältävissä sedimenteissä jopa -450 mV. (Atlas ja Bartha 1998)  $E_h$ -potentiaalin muutos sekoittumattoman kontaminoituneen polttoaineen varastosäiliön vesifaasissa on esitetty kuvassa 5.1 (s. 36).

### ***Veden saatavuus***

Vesi on kaikille organismeille elämisen edellytys ja veden saatavuus vaikuttaa niiden kasvuun. Veden saatavuutta kuvataan veden aktiivisuudella ( $a_w$ ), joka on aineen tai liuoksen kanssa tasapainotilassa olevaan ilman höyrynpaineen suhde puhtaan veden höyrynpaineeseen. Sen lukuarvot vaihtelevat välillä 0 – 1. (Madigan ja Martinko 2006; Passman 2003)

Suurin osa tunnetuista bakteereista ei kasva veden aktiivisuuden ollessa alle 0.95, mutta jotkin suolaisessa ympäristössä viihtyvät (halofiilit) bakteerit voivat kasvaa veden aktiivisuuden ollessa 0.75. Jotkin hiivat ja homeet voivat kasvaa veden aktiivisuuden ollessa 0.60. Erittäin kuivassa ympäristössä kasvavia organismeja kutsutaan kserofiileiksi. (Madigan ja Martinko 2006; Passman 2003)

Eurooppalaisen dieselstandardin (SFS-EN 590) mukaan mineraalidieselin vesipitoisuuden yläraja on 200 mg/kg (0.02 % tai 200 ppm) ja eurooppalaisen biodieselstandardin (SFS-EN 14214) mukaan biodieselin vesipitoisuuden yläraja on 500 mg/kg. Polttoaineen vesiliukoisuus on verrannollinen polttoaineen lämpötilaan, hiilivetyketjujen pituuteen sekä aromaattisten hiilivetyjen määrään. Lyhyet hiilivetyketjut liuottavat enemmän vettä kuin pitkäketjuiset. Lentopetroolissa on 1 ppm vettä jokaista yli 0°C lämpötila-astetta kohti. Aromaattinen hiilivety-yhdiste voi liuottaa viisi kertaa enemmän vettä kuin suoraketjuinen hiilivety-yhdiste. (Robbins ja Levy 2004)



Merkittävälle mikrobikasvulle riittävä vesipitoisuus on 1 %, mutta itiöiden elinkyisyyden ylläpitämiseksi riittää 5 – 80 ppm vesipitoisuus polttoainejärjestelmässä (Yemashova et al. 2007; Gaylarde et al. 1999). Polttoaineen vedenpidätyskyky kasvaa lämpötilan kohotessa, joten polttoaineen jäähtyessä vesi tiivistyy erilleen (Passman 2003). Saastamoinen (1996) arvioi polttoaineen veden aktiivisuudeksi 0.0016 käyttäen heksadekaania polttoaineseoksen malliaineena. Veden aktiivisuus polttoaineen ja vesifaasin rajapinnalle muodostuvassa biofilmissä on suurempi kuin 0.99 (Passman 2003).

### ***Lämpötila***

Lämpötila on yksi merkittävimmistä mikrobien kasvua ja hengissä säilymistä säätelevä ympäristötekijä. Optimilämpötilassa entsymaattiset reaktiot tapahtuvat maksiminopeudella. Maksimilämpötilan yläpuolella solu ei enää kykene toimimaan normaalisti, ja kasvu ei ole mahdollista. Minimilämpötilan alapuolella kasvua ei enää tapahdu. (Madigan ja Martinko 2006)

Organismit on jaoteltu erilaisiin ryhmiin niiden optimilämpötila-alueiden mukaan. Psykrofiilisten mikrobien optimilämpötila on alle 15°C. Psykrotoleranttien optimilämpötila on 20 – 40°C, mutta ne kasvavat myös 0°C:ssa. Mesofiilisten mikrobien kasvun optimilämpötila on 25 – 40°C. Termofiilisten mikrobien lämpötilaoptimi on yli 45°C ja hypertermofiilisten yli 80°C. Korkeita lämpötiloja sietäviä mikrobeja kutsutaan termotoleranteiksi. (Madigan ja Martinko 2006)

Polttoaineissa kasvavien mikro-organismien on havaittu esiintyvän lämpötila-alueella 4 – 60°C. Hiilivetyjä hapettavien mikro-organismien diversiteetin on havaittu olevan suurin lämpötilan ollessa 25 – 30°C. (Yemashova et al. 2007; Chung et al. 2000) Mikrobien kasvu ja entsymaattiset reaktiot tapahtuvat yleisesti hitaammin matalassa lämpötilassa korkeaan lämpötilaan verrattuna. Tästä syystä polttoaineen laadun biologinen heikentyminen tapahtuu nopeammin trooppisessa ja lauhkeassa ilmastossa kuin napaseudun ilmastossa. (Passman 2003)

### ***pH***

Jokaisella organismilla on optimi-pH sekä pH-alue, jossa se toimii. Matalaa pH:ta suosivia mikrobeja kutsutaan asidofiileiksi ja korkeaa pH:ta suosivia puolestaan alkalifiileiksi. Suurin osa luonnossa esiintyvistä organismeista esiintyy pH-alueella 5 – 9. Homeet ovat sietävät yleensä paremmin happamampia elinolosuhteita kuin bakteerit ja niitä esiintyy eniten pH-alueella 4.5 – 6.5. (Madigan ja Martinko 2006; Passman 2003)

pH kuvaa vesiliuoksen vetyionipitoisuutta eli happamuutta. Polttoaineesta voi olla mahdollista mitata happamuus tai emäksisyys, mutta ne eivät ole pH-arvoon verrattavia. Polttoaineesta tiivistyneen vesifaasin pH on tyypillisesti 6.8 – 8.5, mutta voi olla polttoaineen ja vesifaasin rajapinnalle muodostuvassa biofilmissä huomattavasti matalampi. Puhtaan tai hyvin vähän kontaminoituneen polttoainesäiliön vesifaasin ominaisuudet ovat lähellä sadevettä (pH 6 – 7 ja heikosti puskuroitu). (Passman 2003) Polttoaineissa kasvavien mikro-organismien on havaittu esiintyvän pH-alueella 4 – 9, mutta ne kuitenkin suosivat neutraalia pH:ta (Yemashova et al. 2007). Polttoaineen varastosäiliön vesifaasin pH voi laskea hiilivetyjä käyttävien mikrobien toimesta näiden tuottaessa or-

gaanisia happoja. Sulfaattia pelkistävät bakteerit puolestaan hyödyntävät orgaanisia happoja ja vesifaasin pH nousee. (Robbins ja Levy 2004)

### 5.2.2. Mikrobien kasvu eri faaseissa

Mikrobien on havaittu jakaantuvan epätasaisesti polttoaineiden varastoinnissa. Diesel-polttoainesäiliön vesifaasissa mikrobipitoisuus oli  $8.2 \cdot 10^7$  solua/ml ja säiliön syöttö- ja poistoputkien tasolla (aivan vesifaasin yläpuolella)  $1.9 \cdot 10^8$  solua/ml. Polttoaineefaasissa säiliön alaosassa havaittu mikrobipitoisuus oli  $5.3 \cdot 10^5$  solua/ml, säiliön keskiosassa 117 solua/ml ja säiliön yläosassa ei mikrobeita havaittu ollenkaan. (Yemashova et al. 2007)

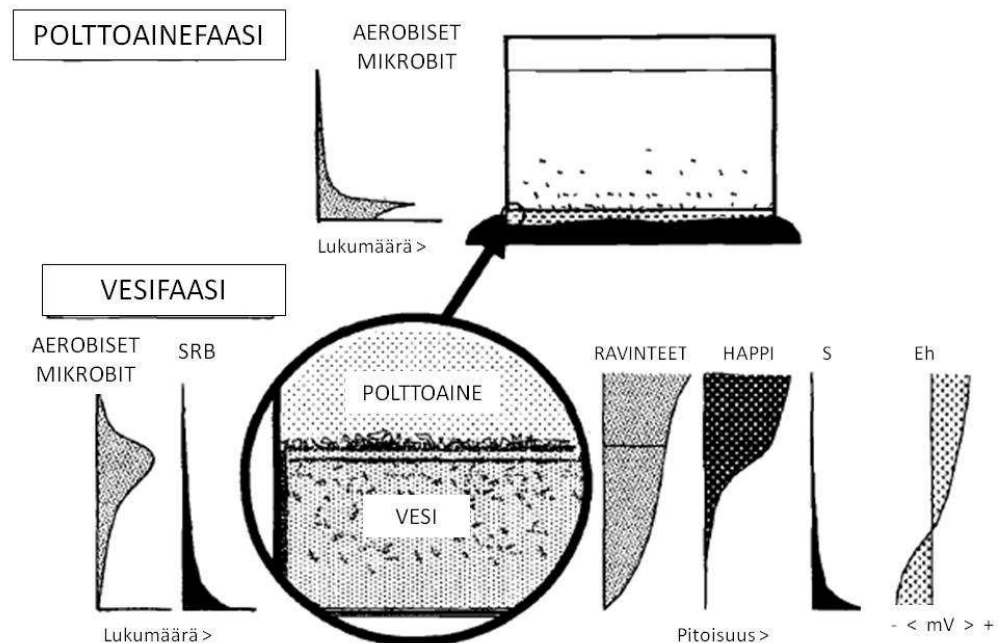
Polttoaineefaasi on vaikea elinympäristö suurimmalle osalle mikrobeista. Ainoastaan itiöt pystyvät selviytymään pitkiä aikoja elinkykyisinä polttoaineessa. Suurin osa polttoaineita kontaminoivista bakteereista ei muodosta itiöitä, joten ne pysyvät elinkykyisinä vain muutamia päiviä tai tunteja, elleivät ne ole vesipisaroissa. Hiivat selviytyvät pidempään ja itiöitä tuottavat homeet rajattoman pitkän ajan. (Passman 2003)

Biofilmi tarkoittaa mikrobien kasvuympäristöä, jossa mikrobiyhteisöt kasvavat pintaan kiinnittyneinä biofilmimatriisissa. Biofilmimatriisi edistää solujen kiinnittymistä toisiinsa ja/tai pintaan ja se koostuu tyypillisesti mikrobien tuottamista solunulkoisista polysakkarideista. Kiinnittymisprosessin aikana mikro-organismien fenotyyppi (ilmiäisy) ja niiden geenien ilmentyminen muuttuvat. Luonnossa suurin osa mikrobeista on biofilmeissä, koska tällainen kasvutapa parantaa mikrobien selviytymistä ja kasvua. Biofilmi estää saalistajien ja myrkyllisten aineiden vaikutukset mikro-organismeille sekä tarjoaa parhaiten ravinteita yleensä ravinneköyhissä luonnon kasvuympäristöissä. (Madigan ja Martinko 2006; Salkinoja-Salonen 2002; Atlas ja Bartha 1998)

Polttoainejärjestelmissä mikrobit kasvavat samoja periaatteita noudattaen kuin luonnossa ja ne muodostavat biofilmejä erilaisille rajapinnoille. Erilaisia rajapintoja polttoainesäiliössä ovat polttoaine:ilma, polttoaine:säiliö, säiliö:ilma, polttoaine:vesi ja vesi:säiliö. Suurin osa (> 99 %) polttoainesäiliössä olevasta biomassasta on havaittu esiintyvän biofilmeissä. Eniten biofilmiä muodostuu yleensä polttoaine- ja vesifaasien rajapinnalle, koska tässä rajapinnassa vettä ja ravinteita on parhaiten saatavilla. Biofilmin muodostus on mahdollista myös säiliön ja ilman rajapinnalle säiliön kaasutilassa, kun haihtuvia orgaanisia hiiliyhdisteitä (VOC) hyödyntävien homeille sopivat kasvuolosuhteet (riittävät ravinne- ja vesipitoisuudet) toteutuvat. Biofilmin muodostuminen antaa mahdollisuuden myös sellaisten mikrobien kasvuille, jotka eivät suoraan käytä polttoainetta hiilenlähteenään, vaan käyttävät niitä käyttävien mikrobien aineenvaihduntatuotteita ravinnokseen. (Passman 2003)

Polttoainejärjestelmissä mikrobit, jotka eivät elä biofilmissä, yleensä laskeutuvat säiliön pohjalle. Pohjalietteestä vain pieni osa on biomassaa ja siellä tapahtuu pääosin sulfaatin pelkistys, koska pohjaliete on tyypillisesti anoksista (hapetonta). (Passman 2003)

Mikrobien tyypillinen jakautuminen sekoittumattomassa kontaminoituneessa polttoaineen varastosäiliössä on esitetty kuvassa 5.1.



**Kuva 5.1.** Mikrolien tyypillinen jakautuminen sekoittumattomassa kontaminoituneessa polttoaineen varastosäiliössä. Polttoaineefaasissa esiintyy yleensä vain aerobisia mikro-*beja*, jotka hitaasti laskeutuvat polttoaineen ja vesifaasin rajapintaan. Hiilivetyravinteiden ja hapen määrät ovat suhteellisen korkeat rajapinnassa ja tämän seurauksena aerobisten mikrolien kasvua tapahtuu vedessä aivan polttoaineefaasin alapuolella. Säiliön pohjalla happipitoisuus on pieni, hapetus-pelkistys-potentiaali ( $E_h$ ) muuttuu negatiiviseksi ja anaerobisten sulfaattia pelkistävien bakteerien (SRB) kasvun seurauksena muodostuu rikkiä (S). (Tekijän modifioima julkaisusta Passman 2003)

### 5.2.3. Haitalliset mikrobipitoisuudet

Raakaöljy ja polttoaineet voidaan luokitella lievästi tai erittäin kontaminoituneiksi niiden vesifaasissa esiintyvän mikro-organismimäärän perusteella. Lievästi kontaminoituneessa vesifaasissa on noin  $10^5$  bakteeria/ml tai  $10^3 - 10^4$  hiivaa ja/tai hometta/ml, kun taas erittäin kontaminoituneessa vesifaasissa  $10^6 - 10^8$  bakteeria/ml tai  $10^4 - 10^6$  hiivaa ja/tai hometta/ml. Puhtaassa polttoaineessa on alle 50 mikro-organismia/ml, mutta vesifaasissa saattaa olla  $10^4$  bakteeria/ml. (Allsopp et al. 2004) Saybolt van Duyn BV (Saastamoinen 1996 mukaan) esittää polttoaineen ja vesifaasin mikrobipitoisuuksille raja-arvoja niissä esiintyvien bakteerien, hiivojen ja homeiden pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (PMY) määrän perusteella. Vähän kontaminoituneessa polttoaineessa on alle 0.5 PMY/ml ja kontaminoituneessa yli 10 PMY/ml. Epätarkalla alueella polttoaineessa on 0.5 – 10 PMY/ml. Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrän normaalipitoisuus vesifaasissa on alle 500 PMY/ml ja kontaminoituneessa vesifaasissa yli 500 PMY/ml. (Saybolt van Duyn BV, Saastamoinen 1996 mukaan)

Mikrobipitoisuuksien vaihtelut ovat suuria ja suuretkaan pitoisuudet eivät välttämättä tarkoita polttoaineen olevan käyttökeltotonta (Koenig 1993, Saastamoinen 1996

mukaan). Polttoaineen laadun huonontumista tapahtuu todennäköisemmin polttoainejärjestelmässä, jossa on täysin kehittynyt biofilmi kuin polttoainejärjestelmässä, josta biofilmi on poistettu tai sitä ei ole muodostunut (Passman 2003).

### 5.3. Kontaminaation vaikutukset polttoaineen laatuun ja varastoitavuuteen

Mikrobikasvun on havaittu vaikuttavan polttoaineissa viidellä tavalla: 1) mikrobien fyysisen läsnäolon haittavaikutukset (rihmasienet ja solunulkoisia polysakkarideja muodostavat bakteerit), 2) mikrobien metabolian haittavaikutukset (lisäaineen hyödyllisyyden menetys) 3) mikrobien metaboliatuotteiden muodostuminen (orgaaniset hapot, rikkivey, rikkihappo ja ammoniakki), 4) biolietteen muodostuminen ja 5) mikrobien aiheuttama metallipintojen korroosio (Robbins ja Levy 2004; Chung et al. 2000).

Mikrobikontaminaation vaikutuksia polttoaineen laatuun ja varastoitavuuteen on esitetty taulukossa 5.1.

**Taulukko 5.1.** Kontaminaation vaikutukset polttoaineen laatuun ja varastoitavuuteen (Tekijän modifioima julkaisuista Robbins ja Levy 2004 sekä Gaylarde et al. 1999).

Vaikutus	Pääasiallinen aiheuttaja (mikro-organismi)
Putkien, venttiilien, suodattimien ja vedenpoistopisteiden tukkeutuminen sekä mitta-antureiden antamat väärt arvot (biofilmin muodostumisen seurauksena)	Homeet, rihmasienet, solun ulkoisia polysakkarideja muodostavat bakteerit
Lisääntynyt vesimäärä	Kaikki
Lietteen muodostuminen	Kaikki
Pinta-aktiivisten aineiden tuotto, jonka seurauksena öljyn/veden emulgoituminen, solujen irtoaminen öljyfaasiin ja lauhduttimen/vedenerottimen toimintahäiriöt	Homeet, aerobiset bakteerit
Säiliöiden ja putkien korroosio	Homeet, anaerobiset bakteerit
Kiintoaineen muodostuminen öljyfaasissa	Kaikki
Hiilivetyjen pilkkoutuminen	Homeet, aerobiset bakteerit
Suodattimien lyhentynyt käyttöikä	Kaikki
Injektorien likaantuminen	Homeet, aerobiset bakteerit
Polttoaineen kohonnut rikkipitoisuus	Sulfaattia pelkistävät bakteerit
Moottorin osien lyhentynyt käyttöikä	Ei määritelty
Säiliöiden suojapinnoitteen rikkoutuminen ja kuluminen	Homeet
Terveysriskit	Endotoksiineja tuottavat bakteerit, opportunistiset patogeenit, sulfaattia pelkistävät bakteerit

## 5.4. Kontaminaation ja mikrobien kasvun esto ja hallinta

### 5.4.1. Varastointi- ja jakelurakenteet

Varastointi- ja jakelurakenteiden suunnittelulla voidaan estää ja hallita mikrobikontaminaatiota ja mikrobien kasvua. Tässä huomioitavia asioita on esitetty taulukossa 5.2. Maanpinnan yläpuolinen varastosäiliö, jonka pohja on kallistettu 30° kulmaan vedenpoiston helpottamiseksi, on helppo ylläpitää ja mikrobikontaminaation aiheuttamat ongelmat ovat vähäisempiä. Säiliön sisäpuolista pinnoitusta ja katodista suojausta käytetään mikrobien aiheuttaman korroosion estoon. (Gaylarde et al. 1999) Ilman mukana kulkeutuvien mikrobien pääsyä polttoainejärjestelmään voidaan vähentää säiliön ilmanvaihdon suunnittelulla (Allsopp et al. 2004).

**Taulukko 5.2.** Varastointi- ja jakelurakenteissa huomioitavia asioita mikrobikontaminaation ja mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa.

Toimenpide	Lähde
Säiliön sisäpuolinen pinnoitus ja katodinen suojaus	Gaylarde et al. 1999
Maanpinnan yläpuolinen varastosäiliö (helpommat vedenpoistojärjestelyt)	Gaylarde et al. 1999
Säiliön ilmanvaihdon suunnittelu	Allsopp et al. 2004

### 5.4.2. Fysikaaliset toimenpiteet

Mikrobikontaminaation ja mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa käytettäviä fysikaalisia toimenpiteitä on esitetty taulukossa 5.3. Koska vesi on elintärkeä mikro-organismien kasvulle ja elinkykyisyydelle, säännöllinen ja huolellinen vedenpoisto on tärkeä ja ensisijainen toimenpide mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa. Polttoaineen kuumennus on yksi tapa torjua mikro-organismien kasvua, mutta suurten säiliöiden kuumennus riittävän korkeaan lämpötilaan on vaikeaa ja vaatii suuria määriä energiaa. (Yemashova et al. 2007) Korkean lämpötilan (> 40 – 60°C) on havaittu heikentävän biodieselin öljyn pysyvyysindeksiä (OSI, oil stability index) ja edistävän biodieselin hajoamista (Dunn 2008; Leung et al. 2006). Öljyn pysyvyysindeksi kuvaa rasva- ja öljynäytteiden suhteellista hapetuskestävyyttä (Dunn 2008). Elektromagneettinen säteilyn käyttö mikrobien kasvun estossa perustuu sen mikro-organismien soluseinämiä rikkovaan vaikutukseen. Erilaisten öljytuotteiden sterilointimenetelmä UV-säteilyn ja supersuuren värähdystaajuuden (SHF) kentän avulla on patentoitu. (Yemashova et al. 2007)

**Taulukko 5.3.** Mikrobikontaminaation ja mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa käytettäviä fysikaalisia toimenpiteitä.

Toimenpide	Lähde
Siisteys ja säännöllinen puhdistus	Yemashova et al. 2007; Gaylarde et al. 1999
Säännöllinen ja huolellinen vedenpoisto varastosäiliöstä	Yemashova et al. 2007; Gaylarde et al. 1999
Suodatus	Boychenko et al. 2008; Yemashova et al. 2007
Ultraviolett- tai sähkömagneettinen säteily (kehitteillä)	Boychenko et al. 2008; Yemashova et al. 2007
Ultraäänikäsittely	Yemashova et al. 2007
Kuumennus	Yemashova et al. 2007

### 5.4.3. Kemikaalit

Mikrobikontaminaation ja mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa käytetyt kemikaalit vaikuttavat pääosin kolmella eri mekanismilla. Kemikaali voi reagoida solun ulkopuolisten rakenteiden kanssa tai solun sisäisesti solukalvojen tai sytoplasman rakenteiden kanssa. (Yemashova et al. 2007)

Mikrobikontaminaation ja mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa käytetyn kemikaalin tulisi täyttää seuraavat vaatimukset (Yemashova et al. 2007; Gaylarde et al. 1999):

- Ei haittavaikutuksia polttoaineen laadulle
- Kemiallinen ja fyysinen yhteensopivuus polttoaineen ja sen lisäaineiden kanssa
- Ei haittavaikutuksia moottoreille, pumpuille ynnä muille
- Toimii laajalle kirjolle mikro-organismeja
- Läpäisee mikrobien tuottaman liman
- Tehokkuus pienissä pitoisuuksissa (1 – 100 ppm)
- Pitkävaikutteisuus
- Kemiallinen ja lämpökestävyys
- Sopiva vesi-öljy-faasien jakaantumiskerroin
- Biohajoavuus ja ympäristöystävällisyys
- Turvallisuus ja varastoinnin helppous
- Kustannustehokkuus

Passman (2003) mukaan biosidikemikaaleja ei tyypillisesti käytetä polttoaineen lisäaineen tapaan, koska mikrobeita esiintyy pääasiassa polttoainejärjestelmän vesifaasissa ja vähän polttoaineefaasissa. Sekä polttoaine- että vesifaasiin liukeneva biosidikemikaali on tehokkain käytettynä kiinteäkattoisissa, pitkäaikaiseen varastointiin tarkoitetuissa polttoainesäiliöissä. Vesiliukoiset kemikaalit puolestaan soveltuvat polttoainejärjestelmille, joissa on suuri polttoaineen vaihtuvuus sekä polttoainevarastoille, joiden epäta-

sainen pohja aiheuttaa veden kertymistä. (Passman 2003) Polttoaineeseen liukenevat biosidikemikaalit lisätään polttoainesäiliöön joko säiliön yläosan kautta (esim. tarkistusluukku tai putkiyhde), esisekoitettuna polttoaineeseen, annosteltuna suoraan säiliöön pumpattavaan polttoaineeseen tai annosteltuna säiliöön, joka on osittain täytetty polttoaineella. Vesiliukoiset biosidikemikaalit lisätään suoraan polttoainesäiliön vesifaasiin. (Robbins ja Levy 2004)

Mikrobikontaminaation ja mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa käytettäviä kemikaaleja on esitetty taulukossa 5.4. Laboratoriokokeissa isotiatsoliiniyhdisteiden ja kvaternaariset ammoniumemästen on havaittu olevan tehokkaimpia polttoainesäiliöiden suojauksessa, kun taas glutaarialdehydin ja formaldehydia vapauttavan aineen havaittiin toimivan vain korkeissa pitoisuuksissa, jos silloinkaan. Vähän kontaminoituneen polttoaineen tehokkaaksi kemikaaliannostukseksi riitti 0.1 ppm ja erittäin kontaminoituneen kemikaaliannostukseksi vaadittiin 10 ppm. (Yemashova et al. 2007; Allsopp et al. 2004). Biosidikemikaalit vaativat yleensä 12 – 24 tunnin kontaktiajan ollakseen mahdollisimman tehokkaita. Hoitotoimenpiteet ja biosidikemikaalin annostus ovat yleensä tapauskohtaisia ja kemikaalin toimittaja antaa yksityiskohtaiset ohjeet kemikaalien käyttöön (Passman 2003).

**Taulukko 5.4.** Mikrobikontaminaation ja mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa käytettäviä kemikaaleja.

Kemikaali	Lähde
Öljyyn liukenevia: isotiatsoliiniyhdisteet, organoborinit, pyridiiniitioniini, heksahydrotriatsiini, imidatsolikarbamaatti	Gaylarde et al. 1999
Veteen liukenevia: morfoliinit, oksatsolidiinit, halidit, aldehydit, fenolit	Gaylarde et al. 1999
Kvaternaariset ammoniumemäkset, orgaaniset kloori-, jodi- ja bromiyhdisteet, monityydyttymättömät typpipitoiset heterosykliset ja aromaattiset amiinit, jotkin metallit (kupari, nikkeli, kadmium, arseeni)	Yemashova et al. 2007

#### 5.4.4. Biologinen torjunta

Korenblum et al. (2008) tutkivat kahden *Bacillus*-kannan (*B. licheniformis* T6-5 ja *B. firmus* H<sub>2</sub>O-1) tuottamien mikrobeita tuhoavien aineiden vaikutusta *B. pumilis* LF4-kannan ja sulfaattia pelkistävien bakteerien muodostamiin biofilmeihin. Näitä kaikkia mikrobeita on havaittu mineraaliöljypohjaisissa polttoaineissa ja niiden varastoinnissa (taulukko 4.1, s. 24). *B. pumilis* LF4-kannan biofilmin muodostus estyi mikrobeita tuhoavien aineiden läsnä ollessa. Lisäksi aineet poistivat ennalta kasvatetun biofilmin ja estivät sen uudelleenkasvun. Sulfaattia pelkistävien mikrobien elinkykyisyys ja biofilmin kiinnittyminen heikkenivät huomattavasti mikrobeita tuhoavien aineiden läsnä ol-

lessa. *B. licheniformis* T6-5 ja *B. firmus* H<sub>2</sub>O-1 –kantojen tuottamien mikrobeita tuhoavien aineilla vaikuttaa olevan potentiaalia biofilmin muodostuksen estämisessä ja biokorroosion vähentämisessä. Polttoaineiden mikrobikontaminaation ja mikrobien kasvun estossa ja hallinnassa käytettäviä biologisia torjuntamenetelmiä ei kuitenkaan ole ilmeisesti vielä käytössä.



## 6. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Tämän diplomityön kokeellisessa osuudessa tutkittiin kahta polttoainetta. Työn tarkoitus oli tutkia polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi, mikrobien määrää ja diversiteettiä eri polttoaineissa, polttoaineiden pilaantumisen etenemistä sekä mikrobikasvun hillitsemistä ja estoa.

### 6.1. Mikrobien kasvu ja sen hallinta polttoaineissa

Polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi tutkittiin kolmella eri mikrobien kasvutavalla: kiinteällä kasvatusalustalla, liukoisessa vesifaasissa sekä biofilmissä.

#### 6.1.1. Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi

##### *Kiinteä kasvatusalusta*

Tutkimuksen tarkoituksena oli verrata standardin IP 385/99 mukaista maljakasvatusmenetelmää menetelmään, jossa polttoainetta 1 käytetään hiilenlähteenä kiinteässä kasvatusalustassa.

Kiinteän kasvatusalustan mineraalisuolaliuos oli Hartmansin et al. (1989) mukainen (taulukko 6.1). Aineet punnittiin ja sekoitettiin MilliQ-veteen. Seos steriloidtiin autoklaivoimalla 121°C:ssa 20 minuutin ajan. Kiinteään kasvatusalustaan lisättiin 1.5 paino-% (15 g/l) agaria ennen autoklavointia. Tätä mineraalisuolaliuosta on käytetty aiemmin polttoaineen biohajoamistutkimuksissa (Owsianiak et al. 2009).

**Taulukko 6.1.** Hartmansin et al. (1989) mukainen mineraalisuolaliuoksen koostumus.

Yhdiste	Määrä
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.55 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.85 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0 g/l
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1 g/l
EDTA	10 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 mg/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 mg/l
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.2 mg/l
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.4 mg/l
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.22 mg/l

Tutkimuksessa käytetty näyte on esitetty taulukossa 6.2. Polttoainenäyte steriilisuodatettiin tutkimusta varten. Tutkimuksessa kokeiltiin kahta tapaa saada polttoaine 1 osaksi kiinteää kasvatusalustaa. Ensimmäisessä yrityksessä polttoaine 1 levitettiin sellaisenaan kiinteälle mineraalisuolakasvatusalustalle ( $V \approx 25$  ml). Levitystä kokeiltiin 0.2 til-% ja 0.4 til-% määrillä polttoainetta 1. Toisessa yrityksessä 2.5 til-% polttoainetta 1 levitettiin kasvatusmaljalle, mineraalisuolaelatusaine ( $V \approx 25$  ml) kaadettiin päälle, elatusainetta sekoitettiin varovasti ja sen annettiin kiinteytyä.

**Taulukko 6.2.** Polttoainetta sisältävän kiinteän kasvatusalustan tutkimisessa käytetty näyte.

Numero	Näyte	Kuvaus
P2	Polttoaine 1 28.1.2009	Väritään kirkas, ei näkyvää sakkaa, säilytetty huoneen lämmössä

### Vesifaasi

Tutkimuksen tarkoituksena oli rikastaa polttoaineessa 1 esiintyviä mikro-organismeja sekä analysoida polttoaineiden 1 ja 2 pilaantumista. Tutkimuksessa käytetyt näytteet on esitetty taulukossa 6.3.

**Taulukko 6.3.** Polttoaineiden 1 ja 2 pilaantumisen tutkimisessa käytetyt näytteet.

Numero	Näyte	Kuvaus
P1	Polttoaine 1 10.9.2008	Ruskeaa saostumaa (ruoste) pohjalla. Hie-man vettä pohjalla.
P2	Polttoaine 1 28.1.2009	Väritään kirkas, ei näkyvää sakkaa, säilytetty huoneen lämmössä
P3	Polttoaine 2 20.1.2009	Kirkas ei sameutta eikä sakkaa
V4	Polttoaine 1 (50 ml) + vesi (900 ml) 16.4.2009	Vesinäyte polttoaineen 1 varastosäiliön vesityksestä, pinnalla polttoaine faasi. Faasirajapinnalla epäpuhtauksia.

Polttoaineiden pilaantumista tutkittiin ja polttoaineessa 1 esiintyviä mikro-organismeja rikastettiin rinnakkaisissa ravistelupullokokeissa. Kaikki ravistelupullokokeet suoritettiin 27°C:ssa 50 rpm:n ravistelussa 500 ml pulloissa. Kokonaisnestetilavuus pulloissa oli 150 ml, josta 50 til-% polttoainenäytettä ja 50 til-% vesifaasia. Vesifaaseja ei puskuroitu.

Polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa käytettiin vesifaasina steriiliä MilliQ-vettä ja steriiliä mineraalisuolaliuosta (taulukko 6.1, s. 42). Hiilenlähteenä käytettiin näytettä P2. Mikro-organismien siirrostukseen käytettiin 1 til-% 20× näytekonsentraattia näytteestä P1. Näytekonsentraatti valmistettiin suodattamalla 200 ml näytettä P1 0.45 µm selluloosasuodattimen (Whatman) läpi, pesemällä suodatin 0.1 til-% polyoksytyleeni(20)sorbitaanimonoo-oleaatilla (Tween 80<sup>®</sup>, Merck Schuchardt OHG) ja huuhtomalla se ¼-vahvuisella Ringer's liuoksella (Merck KGaA) standardin IP 385/99 mukaisesti.

Lopuksi mikrobit eluoitiin suodattimelta 10 ml:n ¼-vahvuista Ringer's liuosta standardin IP 385/99 mukaisesti. Suodatukseen käytetyt välineet ja reagenssit olivat steriilejä.

Polttoaineen 2 pilaantumisen tutkimisessa käytettiin vesifaasina suodatettua ja steriloitua näytettä V4 (polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesinäyte) ja steriiliä mineraalisuolaliuosta (taulukko 6.1, s. 42). Hiilenlähteenä käytettiin näytettä P3. Mikro-organismien siirrostukseen käytettiin 0.01 til-% laimennosta polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa rikastetusta biomassasta (polttoaine 1: mineraalisuolaliuos).

Jokaisesta polttoaine ja vesifaasi-koejärjestelystä tehtiin kaksi rinnakkaista ja niille kaksi kontrollia. Kontrollit olivat negatiivinen (steriilisuoatettu polttoaine hiilenlähteenä) ja ei-siirrostettu. Kuva koejärjestelyistä on esitetty kuvassa 6.1.



**Kuva 6.1.** Polttoaineen 1 (kuva vasemmalla) ja polttoaineen 2 (kuva oikealla) pilaantumisen tutkimisessa käytetyt koejärjestelyt.

Polttoaineiden pilaantumista seurattiin ravistelupulloissa, kunnes biomassan kasvu oli silmämääräisesti merkittävää. Polttoaineessa 1 esiintyviä, rikastettuja mikro-organismeja tarkasteltiin faasikontrastimikroskopiaalla Zeiss Axiocop 2 – mikroskoopilla (Zeiss). Koepullot valokuvattiin kerran viikossa ja vesifaasista otettiin näyte pH:n, liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuuden ja haihtuvien rasvahappojen pitoisuuksien analysoimiseksi. Koepulloihin lisättiin vesifaasia otettua näytettä vastaava tilavuus.

pH-mittaukseen käytettiin pH315i pH-laitetta ja pH-elektrodia (WTW) ja se suoritettiin näytteenottopäivänä. DOC-pitoisuuden ja rasvahappojen pitoisuuden analysointia varten näytteet suodatettiin 0.45 µm polyetterisulfonikalvon (Pall Life Sciences) läpi. DOC-pitoisuus määritettiin Shimadzu TOC-V<sub>CPH</sub> Total Organic Carbon – analyysaattorilla (Shimadzu) ja määrittäminen tehtiin standardin SFS-EN 1484 (1997) mukaisesti. Analyysissä käytettiin kolmea tai neljää standardi DOC-pitoisuusnäytettä tulosten luotettavuuden varmistamiseksi. Rasvahappojen pitoisuus määritettiin HP 5890II – kaasukromatografilla (Hewlett-Packard), jossa oli HP-INNOWax (19091N-013) kolonni ja liekki-ionisaatiodetektor (FID). Injektorin lämpötila oli 200°C ja detektorin 220°C. Kantajakaasuna käytettiin heliumia. Kolonniuunin lämpötila oli ohjelmoitu seuraavasti: 80°C 2 min ajan, lämpötilan nosto 100°C:een 20°C/minuutissa, lämpötilan nosto 150°C:een 10°C/min ja lopuksi 150°C 5 min ajan. Näytteisiin lisättiin oksaalihappoa

ennen analyysiä. Analysoidut haihtuvat rasvahapot olivat etanoli, butanoli, asetaatti, propionaatti, butyraatti, isobutyraatti, pentaanihappo ja heptaanihappo.

### **Biofilmi**

Biofilmin muodostumista tutkittiin polttoaineen 1 varastosäiliöiden pinnoitemateriaalilla päällystettyjen mikroskoopin objektilasien avulla. Tutkimuksessa käytetyt näytteet on esitetty taulukossa 6.4.

**Taulukko 6.4.** Biofilmin muodostumisen tutkimisessa käytetyt näytteet.

Numero	Näyte	Kuvaus
V4	Polttoaine 1 (50 ml) + vesi (900 ml) 16.4.2009	Vesinäyte polttoaineen 1 varastosäiliön vesityksestä, pinnalla polttoaine faasi. Faasirajapinnalla epäpuhtauksia.
P5	Polttoaine 1 16.4.2009	Polttoainenäyte, väriltään samea. Pohjalla runsaasti tummaa sakkaa (ruoste?) ja hieman vettä
P6	Polttoaine 1 28.1.2009	Kirkas, puhdas
P16	Polttoaine 1 15.12.2008	Näyte polttoaineen 1 varastosäiliön pesusta.

Polttoaineen 1 varastosäiliöiden pinnoitus koostuu kolmesta materiaakerroksesta. Ensimmäinen kerros on Inerta Primer 3, keskimmäinen kerros Inerta 51 ja pintakerros Inerta 50, väri TM-3714/95. Objektilasien päällystyksessä käytettiin samoja pinnoitemateriaaleja. Inerta Primer 3 on kaksikomponenttinen epoksireaktiopohjamaali, Inerta 51 on kaksikomponenttinen liuoteohenteinen epoksireaktiomaali ja Inerta 50 on kiiltävä, kaksikomponenttinen epoksireaktiopintamaali ja -lakka (Teknos Oy 2010).

Pinnoitemateriaaleilla päällystetyt objektilasit sijoitettiin 50 ml polypropeeniputkiin, joissa oli 50 til-% polttoainenäytettä ja 50 til-% vesifaasia (kokonaistilavuus 34 ml). Hiilenlähteenä käytettiin näytettä P5. Vesifaaseja oli neljä: 1) puskuroitu ja steriili mineraalisuolaliuos (taulukko 6.1, s. 42), 2) steriili mineraalisuolaliuos (taulukko 6.1, s. 42) 3) suodatettu, puskuroitu ja steriili näyte V4 ja 4) suodatettu ja steriili näyte V4. Näyte V4 oli polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä. Vesifaasit puskuroitiin 250 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaanilla (TRIS-puskurilla). Jokaisesta polttoaine 1 ja vesifaasi-koejärjestelystä tehtiin kaksi rinnakkaista ja niille yksi kontrolli. Kontrolli oli negatiivinen (steriilisuodatettu polttoaine hiilenlähteenä, näyte P6). Biofilmin muodostumistutkimus tehtiin 27°C:ssa 100 rpm:n ravistelussa. Muoviputket olivat kallistettuina 45° kulmaan.

Biofilmin muodostusta tutkittiin myös pelkässä polttoaineessa. Koejärjestely oli sama kuin edellä, mutta muoviputkissa oli 34 ml polttoainenäytettä P16 (kaksi rinnakkaisena). Kontrollina käytettiin steriilisuodatettua polttoainetta (näyte P16).

Tutkimusjakson lopuksi pinnoitemateriaaleilla päällystetyille objektilaseille muodostuneet biofilmit valokuvattiin ja vesifaasien pH mitattiin kuten edellä. Biofilmin mikrobien kokonaismäärät määritettiin fluoresoivan DNA-spesifisen DAPI-värjäyksen

avulla epifluoresenssimikroskopiolla kuten kappaleessa 6.2.2. DAPI-värjäystä varten näkyvä biofilmi irrotettiin steriilisti ja liuotettiin 40 ml ¼-vahvuiseen Ringer's liuokseen (Merck KGaA). Biofilmisuspensio suodatettiin kuten kappaleessa 6.2.2.

### 6.1.2. Lämpötilan vaikutus mikrobikasvuun polttoaineessa

Lämpötilan vaikutusta mikrobikasvun kinetiikkaan polttoaineessa 1 tutkittiin kolmessa lämpötilassa: 6°C, 27°C ja 37°C. Tutkimuksessa käytetyt näytteet on esitetty taulukossa 6.5.

**Taulukko 6.5.** Lämpötilan vaikutuksen tutkimisessa mikrobikasvuun polttoaineessa 1 käytetyt näytteet.

Numero	Näyte	Kuvaus
V4	Polttoaine 1 (50 ml) + vesi (900 ml) 16.4.2009	Vesinäyte polttoaineen 1 varastosäiliön vesityksestä, pinnalla polttoaine faasi. Faasirajapinnalla epäpuhtauksia.
P6	Polttoaine 1 28.1.2009	Kirkas, puhdas
P7	Polttoaine 1 28.1.2009	Kirkas, puhdas
P8	Polttoaine 1	Kirkas, puhdas

Lämpötilan vaikutusta mikrobikasvun kinetiikkaan polttoaineessa 1 tutkittiin rinnakkaisissa ravistelupullokokeissa. Kaikki ravistelupullokokeet suoritettiin 50 rpm:n ravistelussa 500 ml pulloissa. Kokonaisnestetilavuus pulloissa oli 150 ml, josta 50 til-% polttoainenäytettä ja 50 til-% vesifaasia. Vesifaasit puskuroitiin 250 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaanilla (TRIS-puskurilla).

Hiilenlähteinä käytettiin näytteitä P6, P7 ja P8. Vesifaasina käytettiin puskuroitua ja steriiliä mineraalisuolaliuosta (taulukko 6.1, s. 42) kaikissa lämpötiloissa. Jokaisessa lämpötilassa tehtiin kaksi rinnakkaista koepulloa ja yksi kontrolli. Kontrolli oli ei-siirrostettu, puskuroitua ja steriiliä mineraalisuolaliuosta sisältävä koepullo. 27°C lämpötilassa käytettiin vesifaasin vertailuna lisäksi suodatettua, puskuroitua ja steriiliä näytettä V4 sekä puskuroitua ja steriiliä MilliQ-vettä (yksi koepullo kumpaakin). Mikro-organismien siirrostukseen käytettiin 0.01 til-% laimennosta polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa rikastetusta biomassasta (polttoaine 1: mineraalisuolaliuos), joka oli kasvatettu 27°C:ssa. Mikrobikasvua seurattiin mittaamalla vesifaasin absorbanssi mikrobikasvun nopeuteen soveltuvien aikavälein. Koepulloihin lisättiin vesifaasia otettua absorbanssin mittaukseen otettua näytettä vastaava tilavuus. Vesifaasin absorbanssi mitattiin 420 nm:ssä kvartsikvyetissä olevasta näytteestä Shimadzu UV 1601 spektrofotometrillä (Shimadzu). Vertailunäytteenä käytettiin alkuperäistä vesifaasia.

### 6.1.3. Mikrobikasvun hillintä polttoaineessa

Mikrobikasvun hillintää polttoaineessa 1 tutkittiin anaerobisissa olosuhteissa. Sekä tutkimukseen käytetyt polttoaine- ja vesifaasit käsiteltiin hapettomiksi typpikuplituksella. Tutkimuksessa käytetty näyte on esitetty taulukossa 6.6.

**Taulukko 6.6.** Mikrobikasvun hillinnän tutkimisessa polttoaineessa 1 käytetty näyte.

Numero	Näyte	Kuvaus
P6	Polttoaine 1 28.1.2009	Kirkas, puhdas

Mikrobikasvua anaerobisissa olosuhteissa polttoaineessa 1 tutkittiin rinnakkaisissa ravistelupullokokeissa. Kaikki ravistelupullokokeet suoritettiin 27°C:ssa 50 rpm:n ravistelussa 500 ml pulloissa. Kokonaisnestetilavuus pulloissa oli 150 ml, josta 50 til-% polttoainenäytettä ja 50 til-% vesifaasia. Vesifaasi puskuroitiin 250 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaanilla (TRIS-puskurilla).

Hiilenlähteenä käytettiin hapetonta näytettä P6 ja vesifaasina hapetonta, puskuroitua ja steriiliä mineraalisuolaliuosta (taulukko 6.1, s. 42). Mikro-organismien siirrostukseen käytettiin 0.01 til-% laimennosta polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa rikastetusta biomassasta (polttoaine 1: mineraalisuolaliuos), joka oli kasvatettu 27°C:ssa. Tutkimuksessa tehtiin kaksi rinnakkaista koepulloa ja yksi kontrolli. Kontrolli oli ei-siirrostettu, puskuroitua ja steriiliä mineraalisuolaliuosta sisältävä koepullo.

Anaerobisten olosuhteiden aikaansaamiseksi koepulloihin annosteltavat polttoainenäytteet ja vesifaasit käsiteltiin hapettomaksi typpikuplituksella kaasutiiviissä 120 ml serumpulloissa. Polttoainenäytteiden ja vesifaasien siirto sekä mikro-organismien siirrostus koepulloihin tehtiin anaerobisessa tilassa. Tutkimusjakson lopuksi mitattiin vesifaasin absorbanssi mikrobikasvun todentamiseksi kuten kappaleessa 6.1.2. Vertailunäytteenä käytettiin alkuperäistä vesifaasia.

## 6.2. Mikrobit polttoaineessa

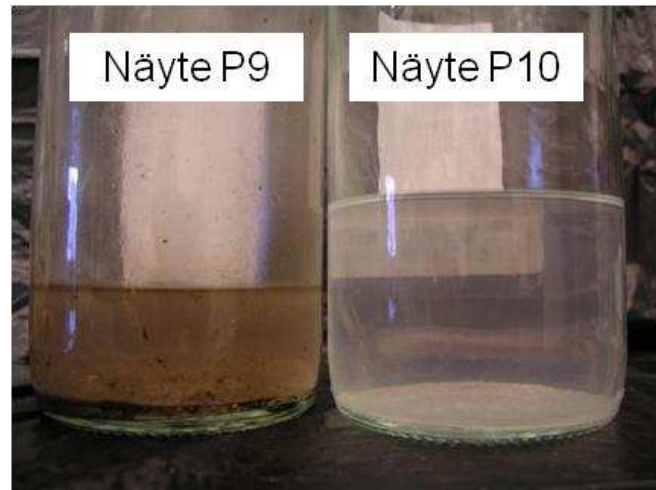
Mikrobien lukumäärää polttoaineessa 1 tutkittiin standardin IP 385/99 mukaisen maljakasvatusmenetelmän ja mikroskoppoinnin avulla sekä mikrobien diversiteettiä molekulaaristen menetelmien avulla.

### 6.2.1. Pesäkkeitä muodostavat yksiköt

Standardin IP 385/99 mukaiset kasvualustat ovat tryptofaani-soija-agar (tryptone soya agar = TSA; CM 0131, Oxoid Ltd) ja mallasuuteagar (malt extract agar = MEA; Oxoid CM 0059, Oxoid Ltd). TSA-kasvatusalusta suosii bakteerien kasvua ja MEA-kasvatusalusta hiivojen ja homeiden kasvua. Tutkimuksessa käytetyt näytteet on esitetty taulukossa 6.7 ja kuvassa 6.2.

**Taulukko 6.7.** Mikrobin lukumäärän määrittämisessä standardin IP 385/99 mukaisten maljakasvatusmenetelmien avulla käytetyt näytteet.

Numero	Suodatettu näytemäärä	Näyte	Kuvaus
P9	200 ml	Polttoaine 1 10.9.2008	Ruskeaa saostumaa (ruoste) pohjalla. Hieman vettä pohjalla.
P10	400 ml	Polttoaine 1 9.7.2008	Väritään samea, sakkaa pohjalla.



**Kuva 6.2.** Polttoainenäytteet P9 ja P10.

Mikrobin lukumäärän määrittäminen polttoainenäytteistä tehtiin standardin IP 385/99 menettelytavan B mukaisesti. Näyte suodatettiin 0.45 µm selluloosasuodattimen (Whatman) läpi, suodatin pestiin 0.1 til-% polyoksietyleni(20)sorbitaanimonoleaatilla (Tween 80<sup>®</sup>, Merck Schuchardt OHG) ja huuhdottiin ¼-vahvuisella Ringer's liuoksella (Merck KGaA). Mikrobit eluoiitiin suodattimelta 10 ml:n ¼-vahvuista Ringer's liuosta. Suodatukseen käytetyt välineet ja reagenssit olivat steriilejä.

Kasvatusalustoille maljattiin eluoidusta mikrobisuspensiosta 0.001×–1×-laimennossarja. Jokaisesta laimennoksesta maljattiin kolme rinnakkaista kasvatusmaljaa. Maljaus suoritettiin steriilisti laminaarissa. Kasvatusalustoita inkuboitiin 27°C lämpötilassa viiden vuorokauden ajan. Pesäkkeiden lukumäärä tarkistettiin kolmen vuorokauden inkuboinnin jälkeen ja inkubointijakson lopussa. Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden lukumäärä (PMY/ml) laskettiin seuraavan yhtälön avulla (IP 385/99):

$$N = \frac{CC \cdot 10^5 \cdot DF}{V} \quad (6.1)$$

missä N = pesäkkeitä muodostavien yksiköiden lukumäärä (PMY/ml)

CC = pesäkkeiden lukumäärä, rinnakkaisten kasvatusalustojen keskiarvo

DF = laimennoskerroin

V = suodatetun polttoaineen näytemäärä (l)

### 6.2.2. Kokonaissolumäärä mikroskoppoinnin avulla

Näytteiden kokonaissolumäärät määritettiin fluoresoivan DNA-spesifisen DAPI-värjäyksen avulla epifluoresenssimikroskopialla. Tutkimuksessa käytetyt näytteet on esitetty taulukossa 6.8.

**Taulukko 6.8.** *Mikrobien kokonaislukumäärän määrittämisessä mikroskoppoinnin avulla käytetyt näytteet.*

Numero	Suodatettu näytemäärä	Näyte	Kuvaus
V4	25 ml (vesi)	Polttoaine 1 (50 ml) + vesi (900 ml) 16.4.2009	Vesinäyte polttoaineen 1 varastosisäiliön vesityksestä, pinnalla polttoainefaasi. Faasirajapinnalla epäpuhtauksia.
P9	200 ml	Polttoaine 1 10.9.2008	Ruskeaa saostumaa (ruoste) pohjalla. Hieman vettä pohjalla.
P10	400 ml	Polttoaine 1 9.7.2008	Väritään samaa, sakkaa pohjalla.

Näytteet suodatettiin standardin IP 385/99 mukaisesti (kappale 6.2.1). Suodatukseen käytettiin 0.45 µm polykarbonaattisuodatinta (Millipore). Suodatin värjättiin 1 ml DAPI-liuoksella (4',6'-diamidino-2-fenyyli-indoli; Molecular Probes) viiden minuutin ajan. Värjätty suodatin kiinnitettiin mikroskoopin objektilasiin pisaralla glyseroli/PBS-liuosta (Citifluor). Peitinlasi asetettiin suodattimen päälle käyttäen samaa liuosta.

Ennen mikroskoppointia peitinlasin pinnalle annosteltiin pisara bentsyylibentsoaattia sisältävää immersioöljyä. Solut laskettiin kahdeltakymmeneltä satunnaisesti valitulta alueelta Zeiss Axiocop 2 – epifluoresenssimikroskopilla (Zeiss). Kokonaissolumäärät laskettiin seuraavan yhtälön avulla:

$$Solut / ml = \frac{K_A \cdot C}{V_S} \quad (6.2)$$

missä  $K_A$  = solujen keskimääräinen lukumäärä

$C$  = muunnoskerroin (taulukko 6.9)

$V_S$  = näytteen tilavuus (ml)



**Taulukko 6.9.** Muunnoskertoimet DAPI-värjäyksen solujen lukumäärän laskemiseen.

Ala	Muunnoskerroin C
1×1	$1.46045 \cdot 10^6$
2×2	$3.65113 \cdot 10^5$
3×3	$1.62272 \cdot 10^5$
5×5	$5.84180 \cdot 10^4$
10×10	$1.46045 \cdot 10^4$

### 6.2.3. Molekulaariset menetelmät

Näytteiden soluista erotettiin koko mikrobiston DNA, josta monistettiin tietyn kokoinen fragmentti joko 16S rRNA-geeniä (prokariotit) tai 18S rRNA-geeniä (eukariotit) polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla. Mikrobiston PCR-tuotteina saadut 16S rRNA- tai 18S rRNA-geenifragmentit eroteltiin denaturoivalla gradienttigelielektroforeesilla (DGGE). PCR-tuotteet puhdistettiin, sekvensoitiin ja prokariotit/eukariotit identifioitiin. Tutkimuksessa käytetyt näytteet on esitetty taulukossa 6.10.

Lisäksi näytteestä P10 standardin IP 385/99 mukaisesti TSA-kasvatusalustalla kasvatetuista pesäkkeistä (kappale 6.2.1) valittiin kahdeksan erinäköistä, joiden erilaisuus varmistettiin restriktioentsyymidigestiolla. Restriktioentsyymit tunnistavat DNA:sta tietyn nukleotidisekvenssin ja katkaisevat DNA-juosteen tietystä kohdasta. Yksilöllisten pesäkkeiden PCR-tuotteet puhdistettiin, sekvensointiin ja bakteerit identifioitiin.

**Taulukko 6.10.** Polttoaineen 1 mikrobidiversiteetin määrittämiseen käytetyt näytteet.

Numero	Suodatettu näytemäärä	Näyte	Kuvaus
P9	200 ml	Polttoaine 1 10.9.2008	Ruskeaa saostumaa (ruoste) pohjalla. Hieman vettä pohjalla.
P10	400 ml	Polttoaine 1 9.7.2008	Väritään samea, sakkaa pohjalla.
P11-1 ja P11-2	2 x 200 ml (polttoaine 1)	Polttoaine 1 (700 ml) + vesi (300 ml) 16.4.2009	Vesinäyte polttoaineen 1 säiliön vesityksestä, pinnalla polttoaine- faasi. Faasirajapinnalla epäpuhta- uksia.
P12	1025 ml	Polttoaine 1 18.6.2009	Väritään kirkas, ei sakkaa
R13	-	Biomassa (Polttoaine 1 : MSL)	Polttoaineen 1 pilaantumisen tut- kimisessa rikastettu biomassa (Polttoaine 1: mineraalisuolaliuos)
R14	-	Biomassa (Polttoaine 1 : MilliQ)	Polttoaineen 1 pilaantumisen tut- kimisessa rikastettu biomassa (Polttoaine 1: MilliQ-vesi)
V15	10 ml (vesi)	Polttoaineen 1 säiliön vesinäyte 18.6.2009	Vesi 0.7 l, polttoaine 1 0.3 l. Ve- sifaasi samea ja kellertävä. Faasi- en rajapinnoilla biofilmiä. Hie- man sakkaa pohjalla.

**Suodatus ja DNA:n eristys**

Näytteet suodatettiin standardin IP 385/99 mukaisesti (kappale 6.2.1). Suodatukseen käytettiin 0.45 µm selluloosasuodatinta (Whatman). DNA eristettiin suodattimesta Ultraclean™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) reagenssisarjan avulla. Suodatin laitettiin sellaisenaan raeliuosputkeen DNA:n eristuksen ensimmäisessä vaiheessa. Solut hajotettiin, DNA eristettiin ja puhdistettiin valmistajan maksimisaanto-ohjeen mukaisesti.

**Polymeraasiketjureaktio (PCR)**

Eristetystä DNA:sta monistettiin polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla joko 16S rRNA-geenin sekvenssiä (prokariotit) tai 18S rRNA-geenin sekvenssiä (eukariotit). DNA monistettiin T3000 Thermocycler PCR-laitteella (Biometra).

Prokarioteille käytetyt alukkeet olivat Ba357F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') (Muyzer et al. 1993) ja Un907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') (Lane 1991). M tarkoittaa A- tai C-emästä ja R A- tai G-emästä. F- ja R-kirjaimet alukkeiden nimissä tulevat englanninkielisistä sanoista forward ja reverse. Ne kuvaavat alukkeen kiinnittymistä DNA-juosteen 5'-päähen ja 3'-päähen. Denaturoivan gradienttielektroforeesin (DGGE) tulosten analysointia varten Ba357F-alukkeen 5'-päähen oli lisätty

GC-rikas sekvenssihantä (Muyzer et al. 1996). PCR-reaktioseokseen (taulukko 6.11) lisättiin 5 µl eristettyä templaatti-DNA:ta.

**Taulukko 6.11.** PCR-reaktioseos näytteistä eristetyn koko mikrobiston DNA:n 16S rRNA-geenifragmentin monistukseen PCR-menetelmällä (kokonaisreaktiotilavuus 50 µl).

Reagenssi	Reaktiopitoisuus	Tilavuus (µl)
10× DreamTaq™ puskuri (Fermentas)	1×	5.0
25 mM dNTP (Fermentas)	0.1 mM	0.2
100 µM Ba357F-GC-aluke (Thermo Fisher Scientific)	0.5 µM	0.25
100 µM Un907R -aluke (Thermo Fisher Scientific)	0.5 µM	0.25
20 mg/ml naudan seerumialbumiini (bovine serum albumin, BSA; Fermentas)	0.4 mg/ml	1.0
5 yksikköä/µl DreamTaq™ polymeerasi (Fermentas)	1.25 yksikköä	0.25
PCR-laatuinen vesi (MP Biomedicals)		38.05

Eukariooteille käytetyt alukkeet olivat Euk1A (5' CTG GTT GAT CCT GCC AG 3') (Sogin ja Gunderson 1987) ja Euk516r-GC (5' ACC AGA CTT GCC CTC CCG CCC GGG GCG CGC CCC GGG CGG GGC GGC GGC ACG GGG GG 3') (Amann et al. 1990). Euk516r-alukkeen 3'-päähän oli lisätty GC-rikas sekvenssihantä. PCR-reaktio tehtiin kolmella eri templaatti-DNA-tilavuudella lisäämällä PCR-reaktioseokseen (taulukko 6.12) 1 µl tai 2 µl eristettyä templaatti-DNA:ta tai 1 µl 0.1× laimennettua eristettyä templaatti-DNA:ta.

**Taulukko 6.12.** PCR-reaktioseos näytteistä eristetyn koko mikrobiston DNA:n 18S rRNA-geenifragmentin monistukseen PCR-menetelmällä (kokonaisreaktiotilavuus 50 µl).

Reagenssi	Reaktiopitoisuus	Tilavuus (µl)
10× DreamTaq™ puskuri (Fermentas)	1×	5.0
25 mM dNTP (Fermentas)	0.1 mM	0.2
100 µM Euk1A -aluke (Thermo Fisher Scientific)	0.5 µM	0.25
100 µM Euk516r-GC -aluke (Thermo Fisher Scientific)	0.5 µM	0.25
20 mg/ml naudan seerumialbumiini (bovine serum albumin, BSA; Fermentas)	0.4 mg/ml	1.0
5 yksikköä/µl DreamTaq™ polymeraasi (Fermentas)	1.25 yksikköä	0.25
PCR-laatuinen vesi (MP Biomedicals)		42.05 / 41.05

PCR-ohjelma molemmissa tapauksissa alkoi 5 minuutin DNA:n kaksoisjuosteen denaturaatiolla +95°C lämpötilassa. DNA monistettiin 30 syklillä. Yksi sykli sisälsi 30 sekunnin denaturaation +94°C:ssa, 1 minuutin alukkeiden kiinnittymisen +50°C:ssa ja 2 minuutin DNA:n pidennyksen +72°C:ssa. Sykliä jälkeen seurasi 10 minuutin DNA:n loppupidennys, jonka jälkeen PCR-tuote säilöttiin +4°C lämpötilassa.

PCR-monistus varmistettiin agarosigeelielektroforeesilla. 10 % (5 µl) PCR-tuotteesta sekoitettiin 6× DNA-latausväriin (Fermentas) ennen näytteiden ajoa agarosigeelillä noin 150 V jännitteellä. 1 % agarosigeeli oli valmistettu 1×TAE-puskuriin (40 mM Tris, 20 mM etikkahappo, 1 mM EDTA, pH 8.3) ja värjätty SYBR® safe DNA-geeliväriä (10 mg/ml, Invitrogen). Molekyylikokostandardina oli Generuler™ 100 bp DNA Ladder (2 µl, Fermentas), jota käytettiin referenssinä kaikissa geeleissä. DNA-tuotteen kulkeutuminen visualisoitiin UV-valon avulla.

### ***Denaturoiva gradienttigelielektroforeesi***

Denaturoiva gradienttigelielektroforeesigeeli (DGGE), näytteiden ajaminen ja visualisointi suoritettiin Auvinen et al. (2009) ja Koskinen et al. (2007) mukaan INGENY phor-U 2×2-laitteella (Ingeny International BV). 8 % polyakryyliamidigeelissä (40% bisakryyliamidigeelin varastoliuos, BioRad) käytettiin 30-70% denaturoivaa gradienttia. 100% denaturoiva liuos sisälsi 7 M ureaa (BioRad) ja 40 til-% formamidia (BioRad). Geeli ajettiin 100 V jännitteellä +60°C lämpötilassa 22 tunnin ajan ja värjättiin SYBR® Gold nukleinihappoväriä (Molecular Probes). Erotellut 16S/18S rRNA-geenifragmentit leikattiin geelistä ja eluoiitiin 20 µl PCR-laatuista vettä yön yli +4°C lämpötilassa.

Eluoitu DNA monistettiin polymeraasiketjureaktiolla kuten edellä sillä erolla, että naudan seerumialbumiinin tilalla käytettiin PCR-laatuista vettä (MP Biomedicals). Lisäksi prokariooteille käytetty Ba357F-aluke (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3',

Thermo Fisher Scientific) ja eukariooteille käytetty Euk516r-aluke (5' ACC AGA CTT GCC CTC C 3', Thermo Fisher Scientific) eivät sisältäneet GC-häntää. PCR-monistus varmistettiin agarosigeelielektroforeesilla kuten edellä.

### ***Restriktioentsyymidigestio***

Näytteen P10 standardin IP 385/99 mukaisesti TSA-kasvatusalustoilta kasvatetuista pesäkkeistä (kappale 6.2.1) valittiin kahdeksan erinäköistä. Jokainen pesäke suspensoitiin 10 µl lyysipuskuria (0.05 M NaOH ja 0.25 % SDS) ja sitä lämmitettiin 10 minuutin ajan +95°C lämpötilassa. Lysaatti jäähdytettiin +4°C lämpötilaan ja laimennettiin 90 µl steriiliä vettä. Liuos vorteksoitiin ja sentrifugoitiin (13200 rpm 2 minuutin ajan).

PCR-monistuksessa käytetyt alukkeet olivat Ba27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') (Lane 1991) ja Un907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') (Lane 1991). PCR-reaktioseokseen (taulukko 6.13) lisättiin 2 µl lysaattiliuoksesta sentrifugoinnissa erottunutta nestettä (supernatanttia) templaatiksi 1×- ja 0.25×-pitoisuudessa.

***Taulukko 6.13. PCR-reaktioseos näytteestä P10 standardin IP 385/99 mukaisesti TSA-kasvatusalustalla kasvatettujen pesäkkeiden DNA:n 16S rRNA-geenifragmentin monistukseen PCR-menetelmällä (kokonaisreaktiotilavuus 50 µl).***

<b>Reagenssi</b>	<b>Reaktiopitoisuus</b>	<b>Tilavuus (µl)</b>
10× DreamTaq™ puskuri (Fermentas)	1×	5.0
10 mM dNTP (Fermentas)	0.2 mM	1.0
10 µM Ba27F -aluke (Thermo Fisher Scientific)	0.2 µM	1.0
10 µM Un907R-aluke (Thermo Fisher Scientific)	0.2 µM	1.0
20 mg/ml naudan seerumialbumiini (bovine serum albumin, BSA; Fermentas)	0.2 mg/ml	0.5
2 yksikköä/µl DreamTaq™ polymeraasi (Fermentas)	1.5 yksikköä	2.5
PCR-laatuinen vesi (MP Biomedicals)		37

PCR-ohjelma alkoi 5 minuutin DNA:n kaksoisjuosteen denaturaatiolla +95°C lämpötilassa. DNA monistettiin 30 syklillä. Yksi sykli sisälsi 30 sekunnin denaturaation +94°C:ssa, 30 sekunnin alukkeiden kiinnittymisen +50°C:ssa ja 1 minuutin DNA:n pidentymisen +72°C:ssa. Sykliä jälkeen seurasi 5 minuutin DNA:n loppupidentäminen, jonka jälkeen PCR-tuote säilöttiin +4°C lämpötilassa. PCR-monistus varmistettiin agarosigeelielektroforeesilla kuten edellä.

PCR-tuote käsiteltiin kolmella restriktioentsyymillä (CfoI, EcoRI ja HaeIII). Reaktioseoksia (taulukko 6.14) inkuboitiin yön yli +37°C lämpötilassa.

**Taulukko 6.14.** Restriktioentsyymireaktioseos näytteestä P10 standardin IP 385/99 mukaisesti TSA-kasvatusalustalla kasvatettujen pesäkkeiden DNA:n PCR-monistetun 16S rRNA-geenifragmentin pilkkomiseen CfoI-, EcoRI- ja HaeIII-restriktioentsyymeillä (kokonaisreaktiotilavuus 15 µl).

Reagenssi	Reaktiopitoisuus	Tilavuus (µl)
10× puskuri (Promega)	1×	1.5
10 yksikköä/µl CfoI- ja HaeIII-entsyymit, 12 yksikköä/µl EcoRI-entsyymi (Promega)	15 yksikköä CfoI ja HaeIII, 18 yksikköä EcoRI	1.5
PCR-tuote		9.0
PCR-laatuinen vesi (MP Biomedicals)		3.0

Restriktioentsyymikäsittely varmistettiin agarosigeelielektroforeesilla samaan tapaan kuten edellä. Koko PCR-tuote sekoitettiin 6× DNA-latausväriin (Fermentas) ennen näytteiden ajoa 2 % agarosigeelillä. Molekyylikokostandardina oli Generuler™ 1 kb DNA Ladder (2 µl, Fermentas). Yksilölliset PCR-tuotteet puhdistettiin QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) reagenssisarjan avulla.

### **Sekvensointi**

Näytteiden (taulukko 6.10, s. 51) PCR-DGGE-erotellut 16S rRNA- ja 18S rRNA-geenifragmentit puhdistettiin ja sekvensoitiin Macrogen Inc:ssä Koreassa. Prokarioottien/eukarioottien identifiointi perustui sekvenssivertailuun Center for Biotechnology Information (NCBI)-tietokannassa MegaBLAST-ohjelman avulla (Zhang et al. 2000).

Näytteestä P10 standardin IP 385/99 mukaisesti TSA-kasvatusalustalla kasvatettujen yksilöllisten pesäkkeiden (kappale 6.2.1) puhdistettujen PCR-tuotteiden emäsjärjestys määritettiin (Macrogen Inc) ja verrattiin NCBI-tietokantaan MegaBLAST-ohjelman avulla (Zhang et al. 2000).

## 7. TULOKSET

Tämän diplomityön kokeellisessa osuudessa tutkittiin kahta polttoainetta. Työn tarkoituksena oli tutkia polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi, mikrobien määrää ja diversiteettiä eri polttoaineissa, polttoaineiden pilaantumisen etenemistä sekä mikrobikasvun hillitsemistä ja estoa. Tässä kappaleessa esitetään diplomityön kokeellisessa osuudessa saadut tulokset.

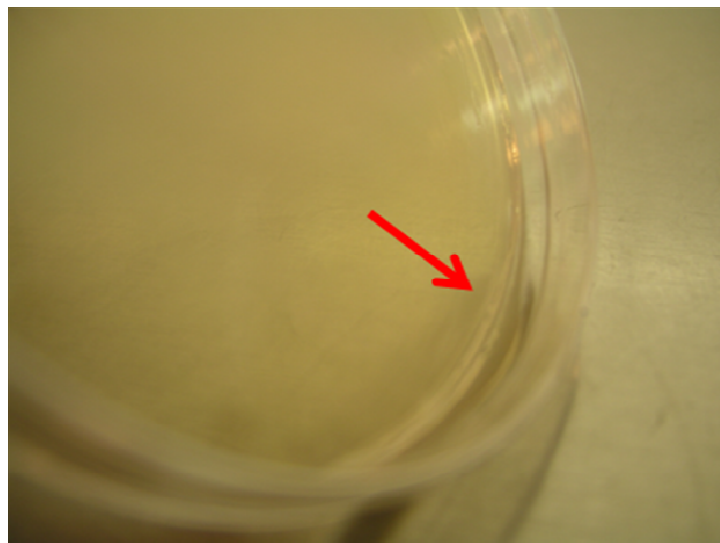
### 7.1. Mikrobien kasvu ja sen hallinta polttoaineissa

Polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi tutkittiin kolmella eri mikrobien kasvutavalla: kiinteällä kasvatusalustalla, liukoisessa vesifaasissa sekä biofilmissä.

#### 7.1.1. Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi

##### *Kiinteä kasvatusalusta*

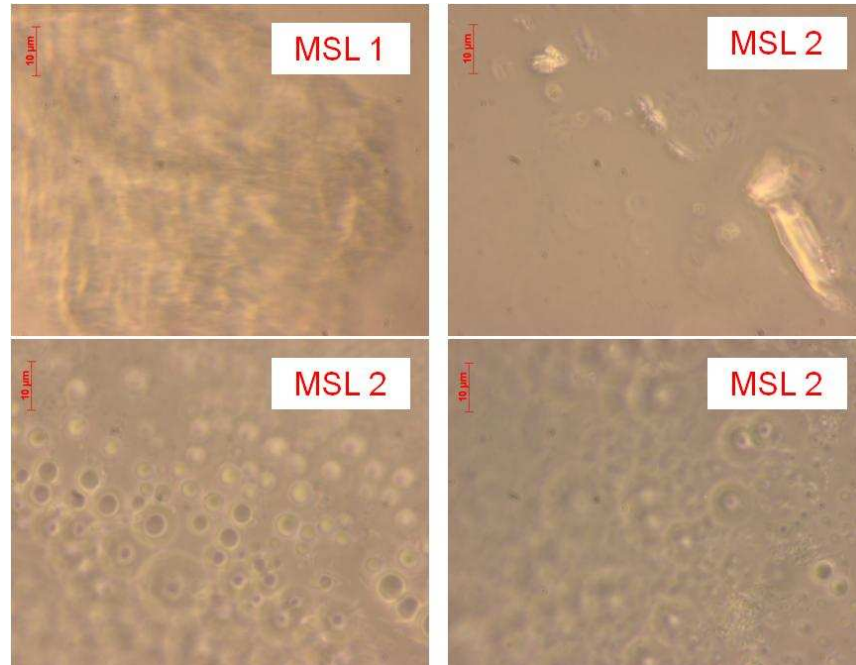
Ensimmäisessä yrityksessä polttoaine 1 levitettiin sellaisenaan kiinteälle mineraalisuolakasvatusalustalle. Polttoaine 1 ei absorboitunut kiinteään kasvatusalustaan. Toisessa yrityksessä polttoaine 1 levitettiin kasvatusmaljalle, mineraalisuolaelatusaine kaadettiin päälle, elatusainetta sekoitettiin varovasti ja sen annettiin kiinteytyä. Polttoaine 1 näytti aluksi sekoittuvan mineraalisuolaelatusaineeseen, mutta noin puolen tunnin kuluttua alustan kiinteydyttyä, se oli erottunut omaksi faasikseen kiinteän kasvatusalustan päälle (kuva 7.1). Polttoainetta 1 ei voida käyttää sellaisenaan hiilenlähteenä kiinteässä kasvatusalustassa.



**Kuva 7.1.** Polttoaineen 1 erottuminen kiinteästä mineraalisuolakasvatusalustasta.

### ***Vesifaasi***

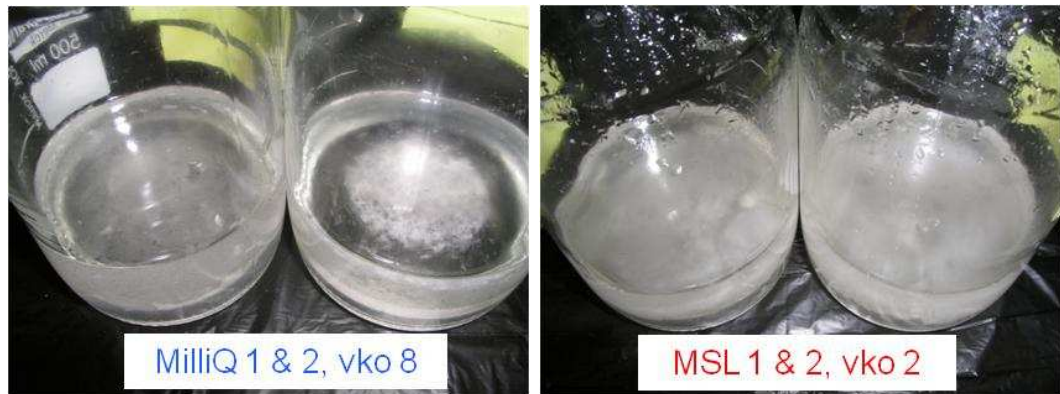
Polttoaineessa 1 esiintyviä mikro-organismeja saatiin rikastettua ja niitä on havainnoitu mikroskoopilla kuvassa 7.2. Tarkempi analyysi rikastetuista mikro-organismeista on esitetty kappaleessa 7.2.



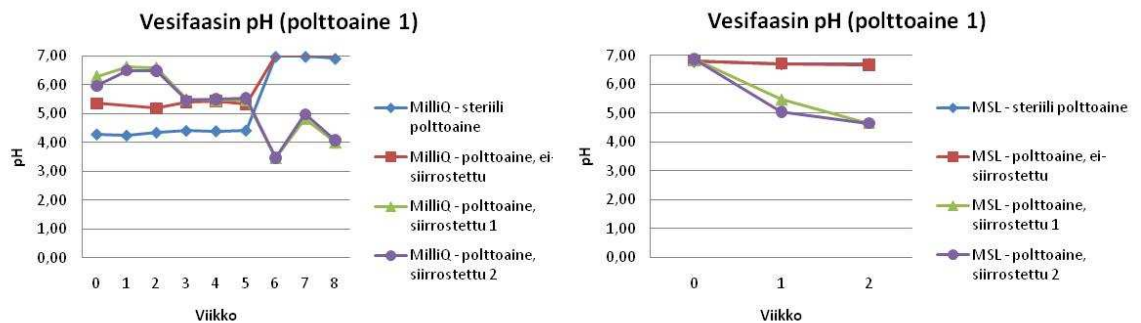
**Kuva 7.2.** *Polttoaineessa 1 esiintyviä, rikastettuja mikro-organismeja mikroskoopilla havainnoituna – yläkuvissa homeita ja alakuvissa hiivoja. Tarkasteltavat biomassanäytteet otettu polttoaine 1 : steriili mineraalisuolaliuos (MSL)-koepulloista, joihin oli siirrostettu 1% v/v 20× näyttekonsentraatti (näyte P1).*

Polttoaineen 1 pilaantumista seurattiin kahden viikon ajan steriilin mineraalisuolaliuoksen kanssa ja kahdeksan viikon ajan steriilin MilliQ-veden kanssa. Kuvat siirrostetuista koepulloista tutkimusjakson lopussa on esitetty kuvassa 7.3. pH-arvot ja liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuudet tutkimusjakson aikana on esitetty kuvissa 7.4 ja 7.5.

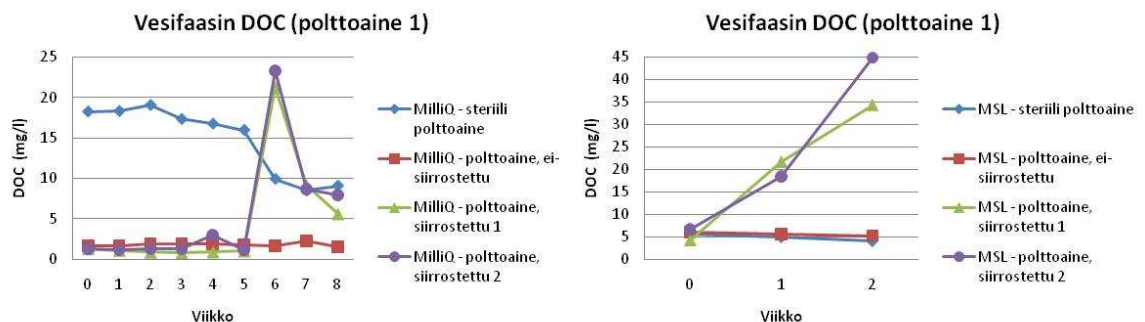




**Kuva 7.3.** Siirrostetut koepullot polttoaineen 1 pilaantumisen seurantatutkimuksessa tutkimusjakson lopussa (8 ja 2 viikkoa). Vesifaaseina steriili MilliQ-vesi (kuva vasemmalla) ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL) (kuva oikealla).



**Kuva 7.4.** Vesifaasin pH polttoaineen 1 pilaantumisen seurantatutkimuksessa. Vesifaaseina steriili MilliQ-vesi (kuva vasemmalla) ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL) (kuva oikealla).



**Kuva 7.5.** Vesifaasin liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuus (mg/l) polttoaineen 1 pilaantumisen seurantatutkimuksessa. Vesifaaseina steriili MilliQ-vesi (kuva vasemmalla) ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL) (kuva oikealla).

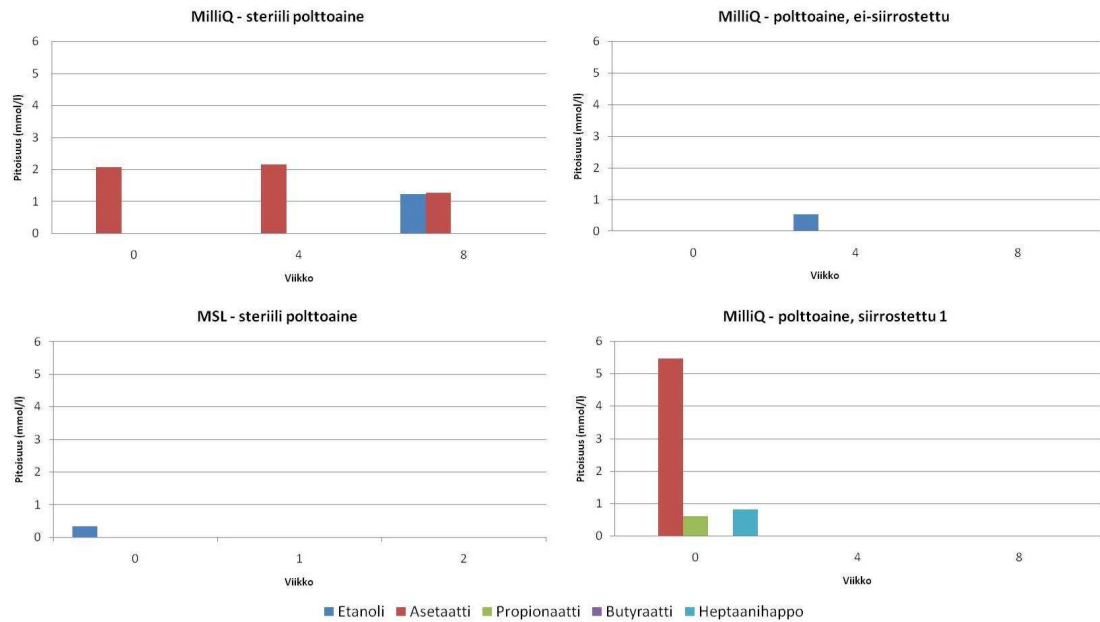
Kun vesifaasina oli puskuroimaton steriili MilliQ-vesi, alku-pH oli erilainen kontroleissa ja siirrostetuissa koepulloissa. Siirrostetuissa koepulloissa havaittiin pH:n laskevan 3 ja uudelleen 6 viikon jälkeen. Biomassan kasvua havaittiin viikolla 6.

Kun vesifaasina oli puskuroimaton steriili mineraalisuolaliuos, alku-pH oli samaa suuruusluokkaa kontrolleissa ja siirrostetuissa koepulloissa. Kontrolleissa ei havaittu pH:n muutoksia tutkimusjakson aikana. Siirrostetuissa koepulloissa havaittiin pH:n laskevan ja biomassan kasvavan ensimmäisen viikon jälkeen. Biomassan kasvu tapahtui pääasiassa faasien rajapinnassa.

Kun vesifaasina oli puskuroimaton steriili MilliQ-vesi, liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuus tutkimusjakson alussa oli hyvin pieni ei-siirrostetussa kontrollissa ja siirrostetuissa koepulloissa. Siirrostetuissa koepulloissa havaittiin DOC-pitoisuuden kasvavan samalla viikolla, kun biomassan kasvua havaittiin (viikko 6). Ei-siirrostetussa kontrollissa ei havaittu muutoksia DOC-pitoisuudessa tutkimusjakson aikana. Steriilissä kontrollissa DOC-pitoisuus tutkimusjakson alussa oli lähes 20-kertainen muihin koepul-loihin verrattuna, mutta se laski noin puoleen tutkimusjakson aikana. Steriilissä kontrol-lissa havaittiin asetaattia koko tutkimusjakson ajan (kuva 7.6), joka on todennäköinen syy havaitulle matalalle pH:lle ja saattaa selittää myös ei-siirrostetusta kontrollista ja siirrostetuista koepulloista poikkeavat DOC-pitoisuudet.

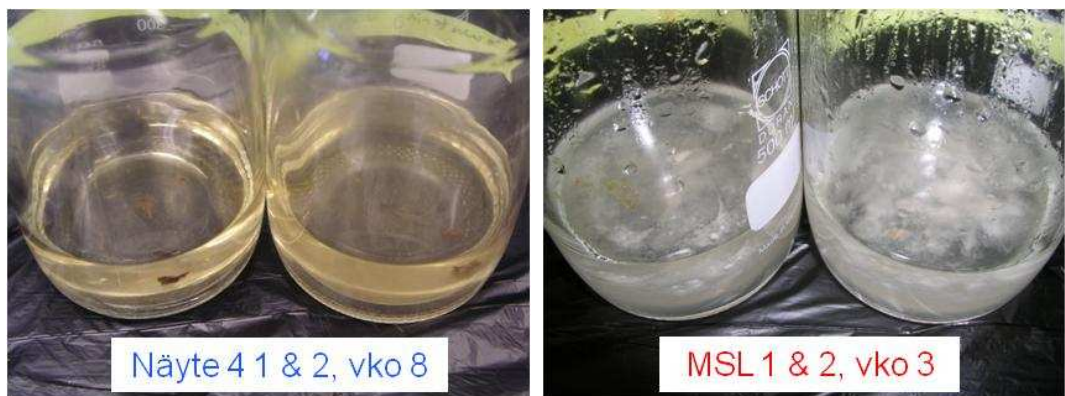
Kun vesifaasina oli puskuroimaton steriili mineraalisuolaliuos, liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuus tutkimusjakson alussa oli pieni sekä kontrolleissa että siirrostetuissa koepulloissa. Kontrolleissa ei havaittu muutoksia DOC-pitoisuudessa tutkimus-jakson aikana. Siirrostetuissa koepulloissa havaittiin DOC-pitoisuuden kasvavan samal-la viikolla, kun biomassan kasvua havaittiin (viikko 1).

Haihtuvien rasvahappojen pitoisuudet on esitetty kuvassa 7.6. Kaikissa vesifaaseissa haihtuvien rasvahappojen pitoisuudet esiintyivät hivenpitoisuuksina. Kun vesifaasina oli steriili MilliQ-vesi, steriilissä kontrollissa havaittiin asetaattia koko tutkimusjakson ajan sekä toisessa siirrostetussa koepullossa ensimmäisellä näytteenottokerralla. Lisäksi mo-lemmissa kontrolleissa sekä toisessa siirrostetussa koepullossa havaittiin etanolia eri aikoina tutkimusjakson aikana. Toisessa siirrostetussa koepullossa havaittiin propionaat-tia ja heptaanihappoa ensimmäisellä näytteenottokerralla. Kun vesifaasina oli steriili mineraalisuolaliuos, steriilissä kontrollissa havaittiin etanolia ensimmäisellä näytteenot-tokerralla.

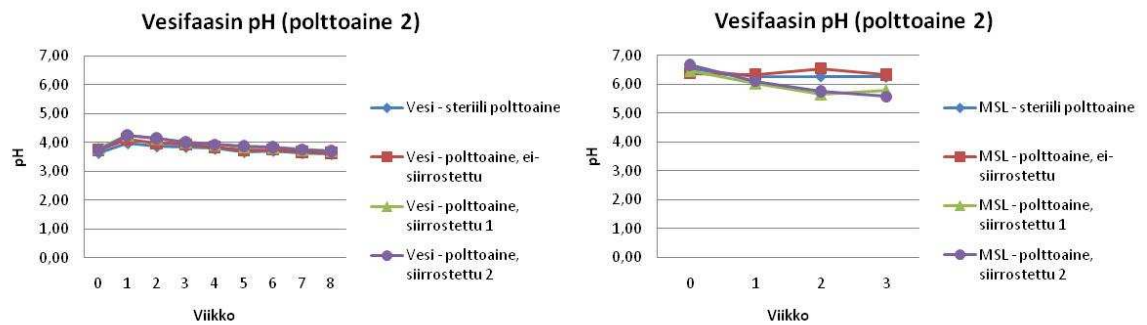


**Kuva 7.6.** Vesifaasin haihtuvien rasvahappojen pitoisuudet (mmol/l) polttoaineen 1 pilaantumisen seurantatutkimuksessa. Vesifaaseina steriili MilliQ-vesi ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL).

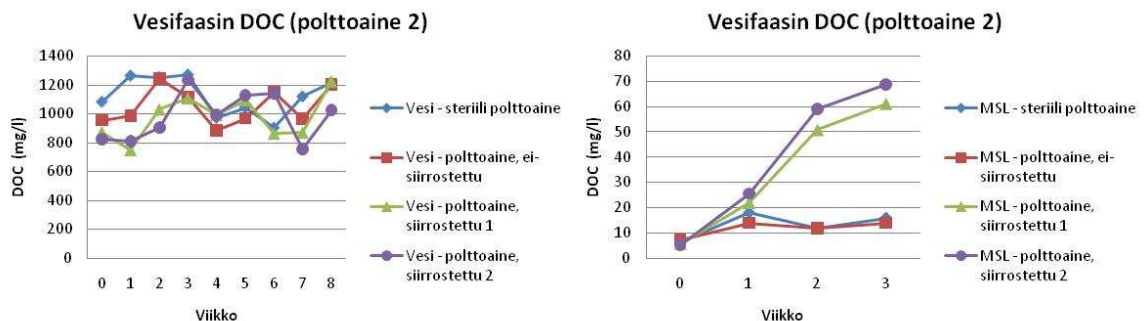
Polttoaineen 2 pilaantumista seurattiin kolmen viikon ajan steriilin mineraalisuolaliuoksen kanssa ja kahdeksan viikon ajan suodatetun, steriilin polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistetun veden (näyte V4) kanssa. Kuvat siirrostetuista koepulloista tutkimusjakson lopussa on esitetty kuvassa 7.7. pH-arvot ja liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuudet tutkimusjakson aikana on esitetty kuvissa 7.8 ja 7.9.



**Kuva 7.7.** Siirrostetut koepullot polttoaineen 2 pilaantumisen seurantatutkimuksessa tutkimusjakson lopussa (8 ja 3 viikkoa). Vesifaaseina suodatettu ja steriili polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi (näyte V4) (kuva vasemmalla) ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL) (kuva oikealla).



**Kuva 7.8.** Vesifaasin pH polttoaineen 2 pilaantumisen seurantatutkimuksessa. Vesifaaseina suodatettu ja steriili polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi (näyte V4) (kuva vasemmalla) ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL) (kuva oikealla).



**Kuva 7.9.** Vesifaasin liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuus (mg/l) polttoaineen 2 pilaantumisen seurantatutkimuksessa. Vesifaaseina suodatettu ja steriili polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi (näyte V4) (kuva vasemmalla) ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL) (kuva oikealla).

Kun vesifaasina oli puskuroimaton, suodatettu ja steriili polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi (näyte V4), alku-pH oli matala ja samaa suuruusluokkaa sekä kontrolleissa että siirrostetuissa koepulloissa. pH:ssa ei tapahtunut merkittäviä muutoksia tutkimusjakson aikana. Hyvin pientä biomassan kasvua havaittiin viikolla 3.

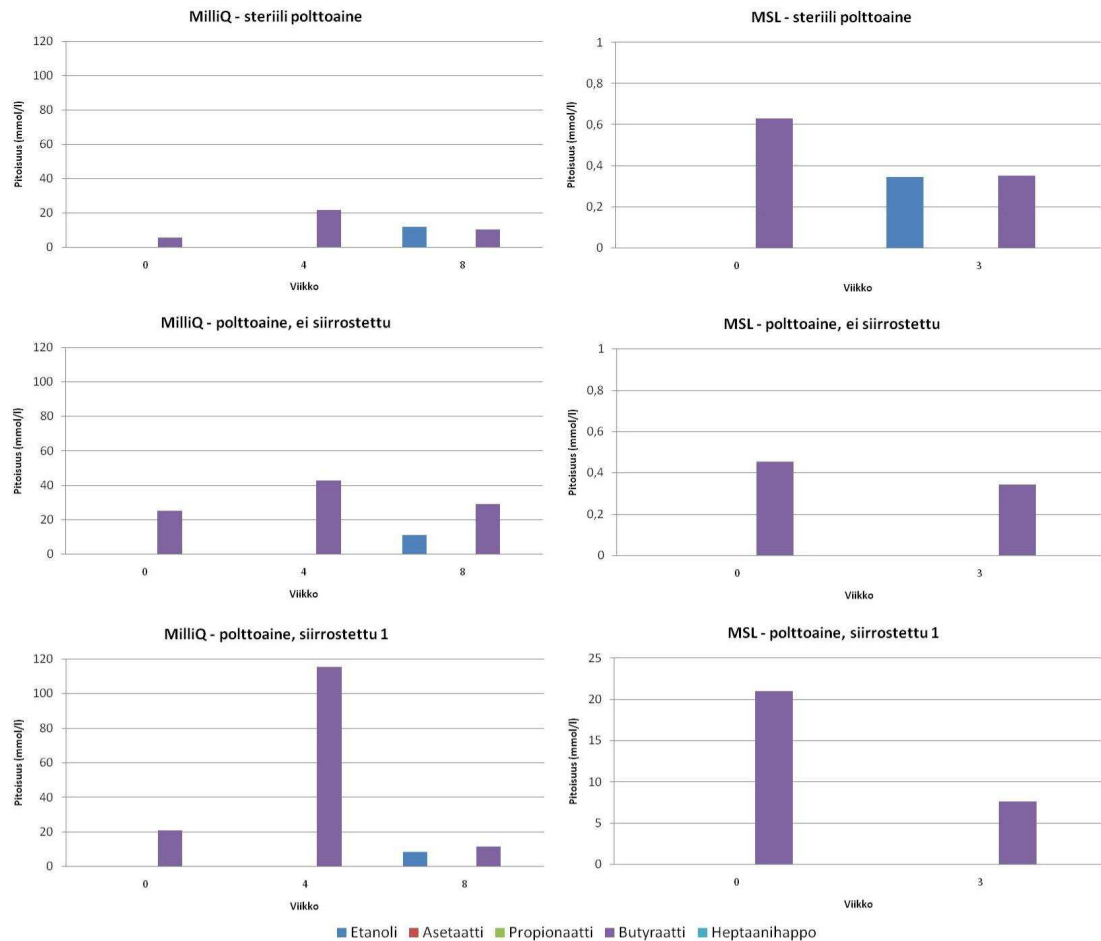
Kun vesifaasina oli puskuroimaton steriili mineraalisuolaliuos, alku-pH oli samaa suuruusluokkaa kontrolleissa ja siirrostetuissa koepulloissa. Kontrolleissa ei havaittu pH:n muutoksia tutkimusjakson aikana. Siirrostetuissa koepulloissa havaittiin pH:n laskevan ja biomassan kasvavan ensimmäisen viikon jälkeen. pH:n lasku ei ollut yhtä nopeaa kuin polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimusjaksolla. Biomassan kasvu tapahtui pääasiassa faasien rajapinnassa, mutta osittain myös polttoaineefaasissa.

Kun vesifaasina oli puskuroimaton, suodatettu ja steriili polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi (näyte V4), liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuus oli korkea sekä kontrolleissa että siirrostetuissa koepulloissa koko tutkimusjakson ajan. Mitatut DOC-pitoisuudet olivat 10 – 100-kertaisia verrattuina muista käytetyistä vesifaaseista mitattuihin pitoisuuksiin tutkimusjakson aikana. Kontrolleissa ja siirrostetuissa koepulloissa havaittiin butyraattia koko tutkimusjakson ajan sekä etanolia toisesta seurantavii-

kosta eteenpäin (kuva 7.10), joka on todennäköinen syy havaitulle matalalle pH:lle ja saattaa selittää myös muista käytetyistä vesifaaseista mitatut poikkeavat DOC-pitoisuudet.

Kun vesifaasina oli puskuroimaton steriili mineraalisuolaliuos, liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuus tutkimusjakson alussa oli pieni sekä kontrolleissa että siirrostetuissa koepulloissa. Kontrolleissa ei havaittu muutoksia DOC-pitoisuudessa tutkimusjakson aikana. Siirrostetuissa koepulloissa havaittiin DOC-pitoisuuden kasvavan samalla viikolla, kun biomassan kasvua havaittiin (viikko 1).

Haihtuvien rasvahappojen pitoisuudet on esitetty kuvassa 7.10. Kun vesifaasina oli suodatettu ja steriili polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi (näyte V4), molemmissa kontrolleissa ja molemmissa siirrostetuissa koepulloissa havaittiin butyraattia (voihappoa) koko tutkimusjakson ajan. Lisäksi molemmissa kontrolleissa ja molemmissa siirrostetuissa koepulloissa havaittiin etanolia toisesta seurantaviikosta eteenpäin. Kun vesifaasina oli steriili mineraalisuolaliuos, molemmissa kontrolleissa ja toisessa siirrostetussa koepullossa havaittiin butyraattia koko tutkimusjakson ajan. Lisäksi steriilissä kontrollissa havaittiin etanolia viimeisellä näytteenottokerralla. Mineraalisuolaliuoskontrolleissa haihtuvien rasvahappojen pitoisuudet olivat hivenpitoisuuksia muiden koepullojen vesifaasien pitoisuuksiin verrattuna.

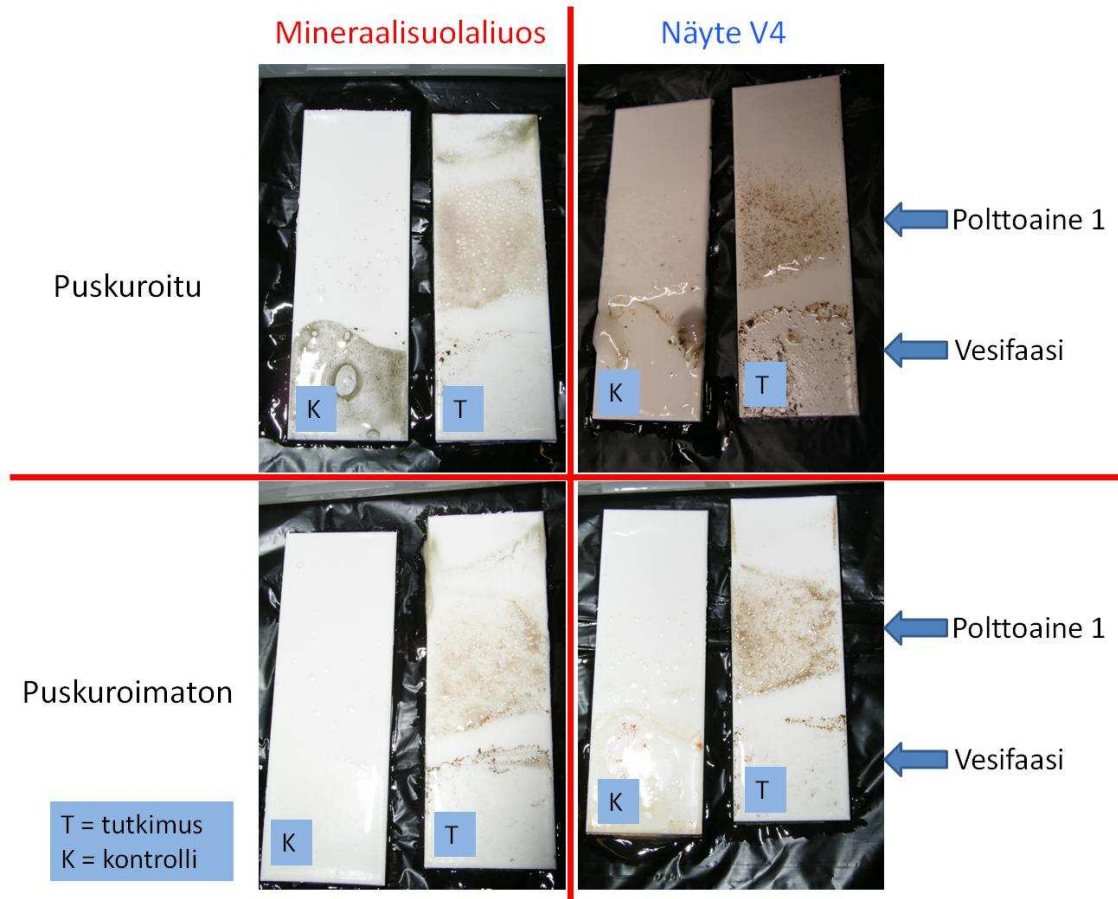


**Kuva 7.10.** Vesifaasin haihtuvien rasvahappojen pitoisuudet (mmol/l) polttoaineen 2 pilaantumisen seurantatutkimuksessa. Vesifaaseina suodatettu ja steriili polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi (näyte V4) (kuvat vasemmalla) ja steriili mineraalisuola-liuos (MSL) (kuvat oikealla). X-akselin mittakaava on erilainen eri kuvissa.

### Biofilmi

Polttoaineen 1 varastosäiliön pinnoitemateriaaleilla päällystettyjä objektilaseja inkuboi-tiin 27°C:ssa polttoainetta 1 ja vesifaasia sisältävissä polypropeeniputkissa biofilmin muodostuksen tutkimiseksi kahdeksan viikon ajan. Biofilmin muodostus on esitetty ku-vassa 7.11.



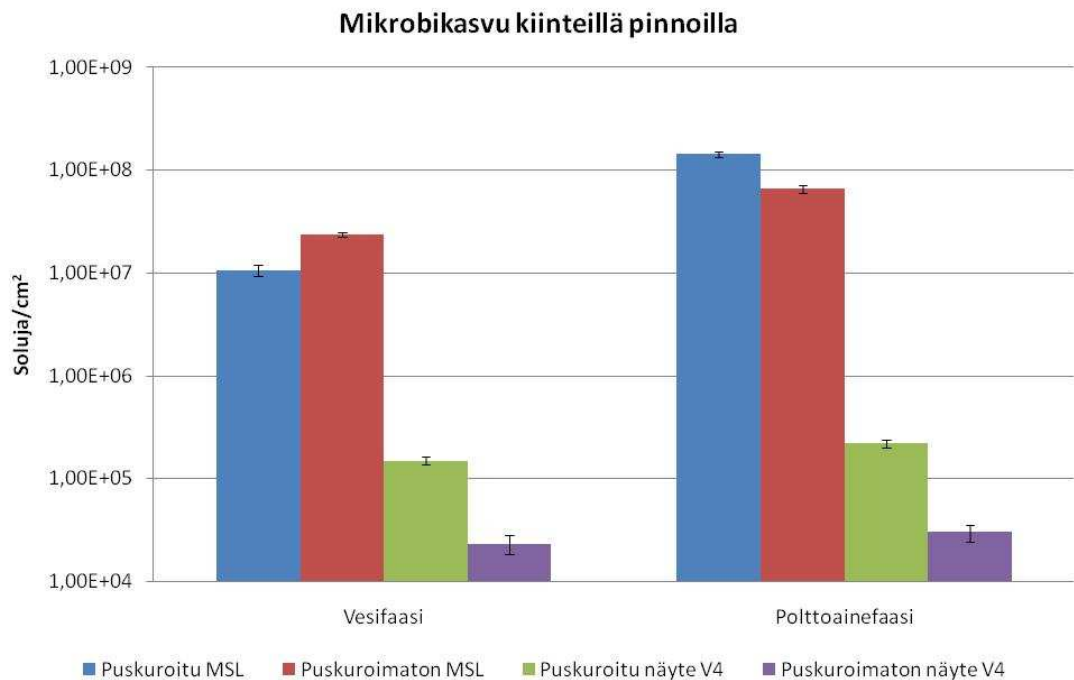


**Kuva 7.11.** Biofilmin muodostus polttoaineen 1 varastosäiliön pinnoitemateriaaleilla päällystetyissä objektilaseissa polttoainetta 1 ja vesifaasia sisältävissä muoviputkissa kahdeksan viikon inkuboinnin jälkeen. Vesifaaseja oli neljä: 1) puskuroitu ja steriili mineraalisuolaliuos (kuva ylhäällä vasemmalla), 2) steriili mineraalisuolaliuos (kuva alhaalla vasemmalla), 3) suodatettu, puskuroitu ja steriili näyte V4 (kuva ylhäällä oikealla) ja 4) suodatettu ja steriili näyte V4 (kuva alhaalla oikealla). Näyte V4 oli polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä. Käytetyt merkinnät T = tutkimus ja K = kontrolli.

Biofilmin kasvua havaittiin sekä polttoaineen että vesifaasien rajapinnoilla. Biofilmi kasvoi myös kontrollien vesifaasissa. Biofilmiä ulkonäkö oli samankaltainen kuin polttoaineen 1 pilaantumisen seurantatutkimuksessa. Ulkonäön perusteella biofilmit muodostuivat pääasiassa sienibiomassasta. Kun pinnoitemateriaaleilla päällystettyjä objektilaseja inkuboitettiin 27°C:ssa neljän viikon ajan pelkästään polttoaineessa 1, biofilmiä ei muodostunut.

Biofilmimikrobien kokonaismäärät on esitetty kuvassa 7.12. Polttoaineefaasin kokonaismikrobimäärät olivat suuremmat kuin vesifaasissa. Mineraalisuolaliuosta sisältävien muoviputkien vesifaasin kokonaissuurekkuudet olivat suuruusluokkaa  $1 \cdot 10^7/\text{cm}^2$  ja polttoaineefaasissa suuruusluokkaa  $1 \cdot 10^8/\text{cm}^2$ . Polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä (näyte V4) sisältävien muoviputkien mikrobipitoisuudet olivat suuruusluokkaa  $10^5/\text{cm}^2$  molemmissa faaseissa, mutta selvästi pienemmät muoviputkessa, jonka vesifaasissa oli

puskuroimatonta näytettä V4. Tässä pH laski arvoon 4, mutta puskuroidussa pH ei muuttunut.

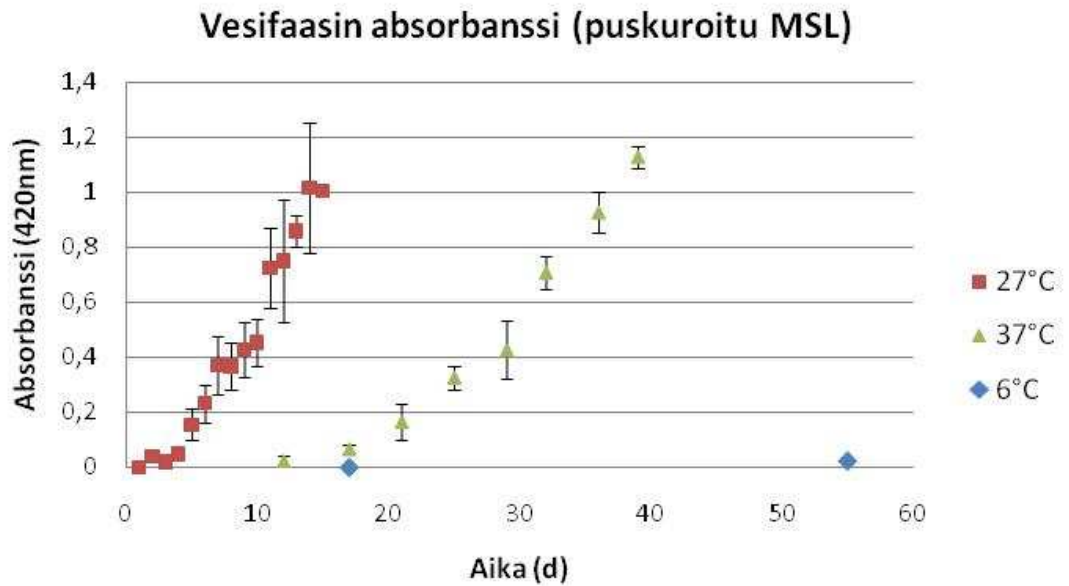


**Kuva 7.12.** Biofilmimikrobien kokonaismäärät polttoaineen 1 varastosäiliön pinnoite-materiaaleilla päälystetyissä objektilaseissa kahdeksan viikon polttoainetta 1 ja vesi-faasia sisältävissä muoviputkissa inkuboinnin jälkeen. Vesifaaseja oli neljä: 1) pusku-roitu ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL), 2) steriili mineraalisuolaliuos (MSL), 3) suodatettu, puskuroitu ja steriili näyte V4 ja 4) suodatettu ja steriili näyte V4. Näyte V4 oli polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä. Virhepalkit kuvaavat biofilmimikro-bien kokonaismäärän keskihajontaa.

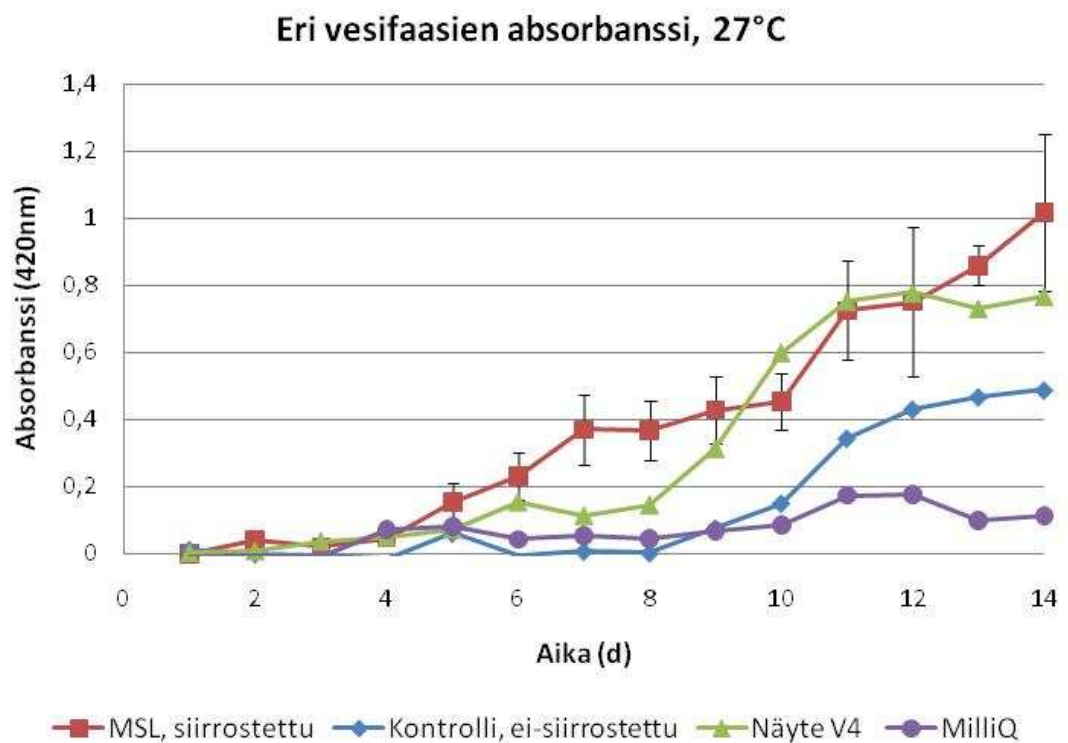
### 7.1.2. Lämpötilan vaikutus mikrobikasvuun polttoaineessa

Lämpötilan vaikutusta mikrobikasvun kinetiikkaan polttoaineessa 1 seurattiin 6°C läm-pötilassa 8 viikkoa (54 vuorokautta), 27°C lämpötilassa 2 viikkoa (14 vuorokautta) ja 37°C lämpötilassa 5½ viikkoa (38 vuorokautta). Mikrobikasvua seurattiin mittaamalla vesifaasin absorbanssi (420 nm) mikrobikasvun nopeuteen soveltuvien aikaväleillä. Läm-pötilan vaikutus mikrobikasvuun eri lämpötiloissa on esitetty kuvassa 7.13 ja 27°C läm-pötilassa eri vesifaaseissa kuvassa 7.14.





**Kuva 7.13.** Vesifaasin absorbanssi (420 nm) mikrobikasvun lämpötilan vaikutustutkimuksessa polttoaineessa 1 6°C, 27°C ja 37°C lämpötiloissa. Vesifaasina puskuroitu ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL). Virhepalkit kuvaavat absorbanssin keskihajontaa.



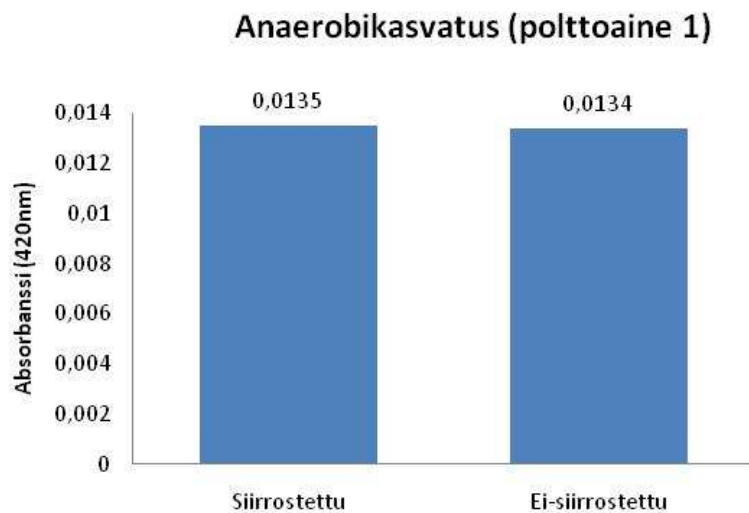
**Kuva 7.14.** Vesifaasien absorbanssi (420 nm) mikrobikasvun lämpötilan vaikutustutkimuksessa polttoaineessa 1 27°C lämpötilassa. Vesifaaseina puskuroitu ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL), suodatettu, puskuroitu ja steriili näyte V4 sekä puskuroitu ja steriili MilliQ-vesi. Näyte V4 oli polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä. Kontrolli oli ei-siirrostettu, puskuroitua ja steriiliä mineraalisuolaliuosta sisältävä koepullo. Virhepalkit kuvaavat absorbanssin keskihajontaa.

Mikrobikasvu oli nopeinta 27°C lämpötilassa. Mikrobikasvussa havaittiin 2 viikon viive 37°C lämpötilassa ja kasvun havaittiin olevan hitaampaa kuin 27°C lämpötilassa. 6°C lämpötilassa ei havaittu mikrobikasvua 8 viikon inkuboinnin aikana.

Mikrobikasvu 27°C lämpötilassa oli nopeinta siirrostetuissa koepulloissa, joissa oli vesifaasina puskuroitua ja steriiliä mineraalisuolaliuosta ja toiseksi nopeinta siirrotetussa koepullossa, jossa oli vesifaasina suodatettua, puskuroitua ja steriiliä näytettä V4 (polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä). Ei-siirrostetussa koepullossa, jossa oli vesifaasina puskuroitua ja steriiliä mineraalisuolaliuosta, havaittiin myös mikrobikasvua, mutta vähemmän kuin siirrostetuissa mineraalisuolaliuosta sisältävissä koepulloissa. Koepullossa, jossa oli vesifaasina puskuroitua ja steriiliä MilliQ-vettä, havaittiin hyvin vähäistä mikrobikasvua.

### 7.1.3. Mikrobikasvun hillintä polttoaineessa

Mikrobikasvua anaerobisissa olosuhteissa polttoaineessa 1 seurattiin 27°C lämpötilassa 8 viikkoa. Tutkimusjakson lopuksi mitattiin vesifaasin absorbanssi (420 nm) mikrobikasvun todentamiseksi (kuva 7.15). Mikrobikasvua ei havaittu anaerobisissa olosuhteissa 8 viikon inkuboinnin jälkeen.



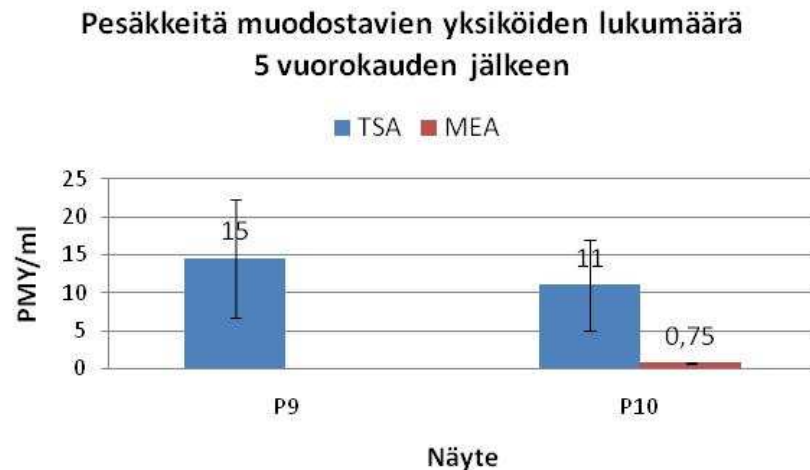
**Kuva 7.15.** Vesifaasin absorbanssi (420 nm) mikrobikasvun hillintätutkimuksessa polttoaineessa 1 27°C lämpötilassa anaerobisissa olosuhteissa 8 viikon inkuboinnin jälkeen. Vesifaasina puskuroitu ja steriili mineraalisuolaliuos (MSL).

## 7.2. Mikrobit polttoaineessa

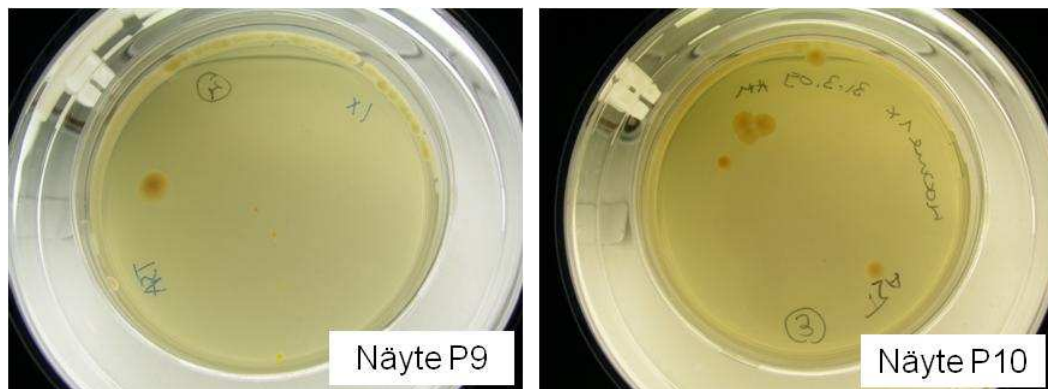
Mikrobien lukumäärää polttoaineessa 1 tutkittiin standardin IP 385/99 mukaisen maljakasvatusmenetelmän ja mikroskoppoinnin avulla. Lisäksi mikrobien diversiteettiä polttoaineessa 1 tutkittiin molekulaaristen menetelmien avulla.

### 7.2.1. Pesäkkeitä muodostavat yksiköt

Näytteiden P9 ja P10 (taulukko 6.7, s. 48) pesäkkeitä muodostavien yksiköiden lukumäärä (PMY/ml) viiden vuorokauden kasvatuksen jälkeen on esitetty kuvassa 7.16. Näytteistä erotettujen mikro-organismien pesäkkeitä muodostavien yksiköiden esiintymistapa kasvatusalustalla (TSA) on esitetty kuvassa 7.17.



**Kuva 7.16.** Näytteistä P9 ja P10 erotettujen mikro-organismien pesäkkeitä muodostavien yksiköiden lukumäärä (PMY/ml) TSA- ja MEA-kasvatusalustoilla 5 vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Virhepalkit kuvaavat pesäkkeitä muodostavien yksiköiden lukumäärän keskihajontaa.

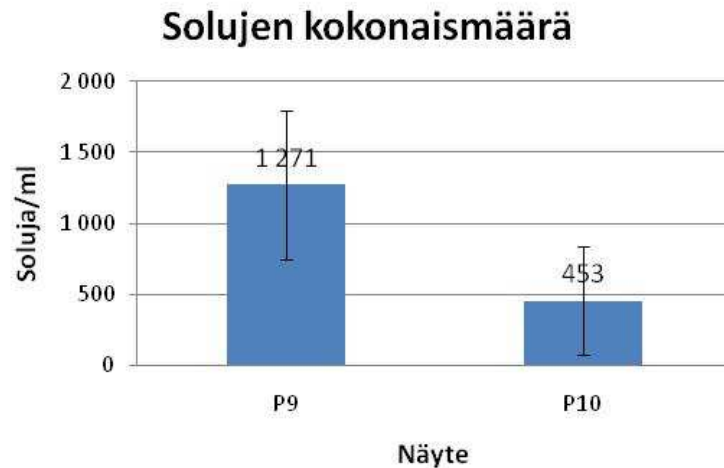


**Kuva 7.17.** Näytteestä P9 (kuva vasemmalla) ja näytteestä P10 (kuva oikealla) erotettujen mikro-organismien pesäkkeitä muodostavien yksiköiden esiintymistapa kasvatusalustalla (TSA).

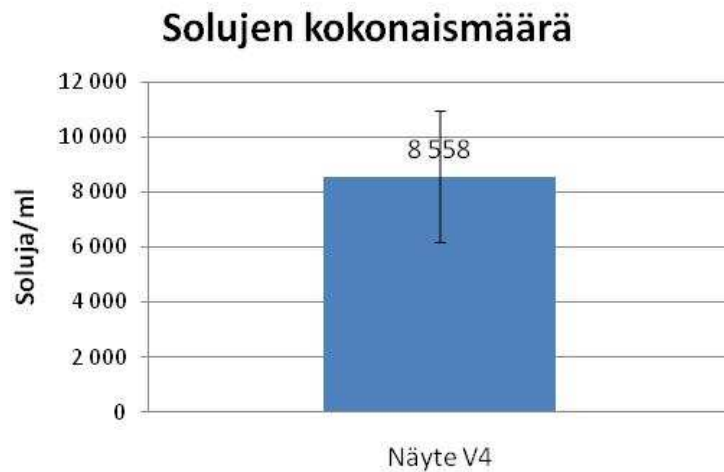
Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä oli molemmissa näytteissä hyvin pieni. Pesäkkeitä havaittiin pääosin kasvatusmaljojen reunoilla. Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä MEA-kasvatusalustalla oli pienempi kuin TSA-kasvatusalustalla. MEA-kasvatusalustalla pesäkkeet olivat lähinnä homeita ja TSA-kasvatusalustalla bakteereja.

### 7.2.2. Kokonaissolumäärä mikroskopian avulla

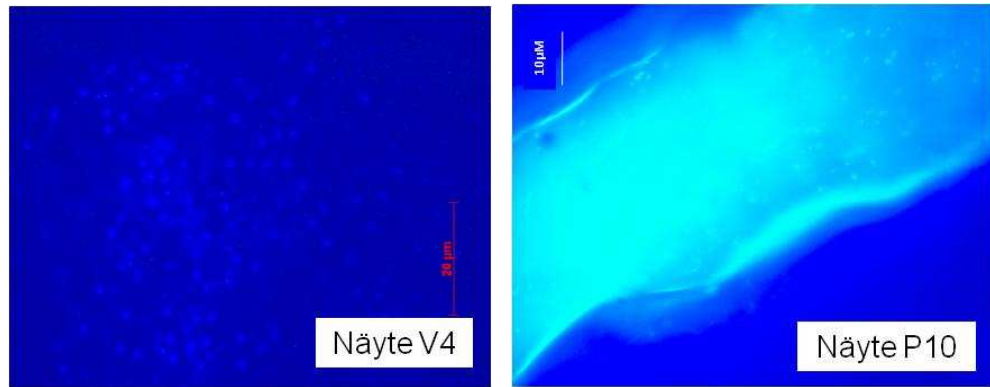
Näytteiden P9 ja P10 (taulukko 6.8, s. 49) kokonaissolumäärät on esitetty kuvassa 7.18 ja näytteen V4 (taulukko 6.8, s. 49) kuvassa 7.19. Mikroskooppikuvat näytteiden V4 ja P10 DAPI-värjätystä soluista on esitetty kuvassa 7.20.



**Kuva 7.18.** Näytteiden P9 ja P10 kokonaissolumäärät mikroskopian ja DAPI-värjäyksen avulla määritettynä. Virhepalkit kuvaavat kokonaissolumäärän keskihajontaa.



**Kuva 7.19.** Näytteen V4 kokonaissolumäärä mikroskopian ja DAPI-värjäyksen avulla määritettynä. Virhepalkit kuvaavat kokonaissolumäärän keskihajontaa.

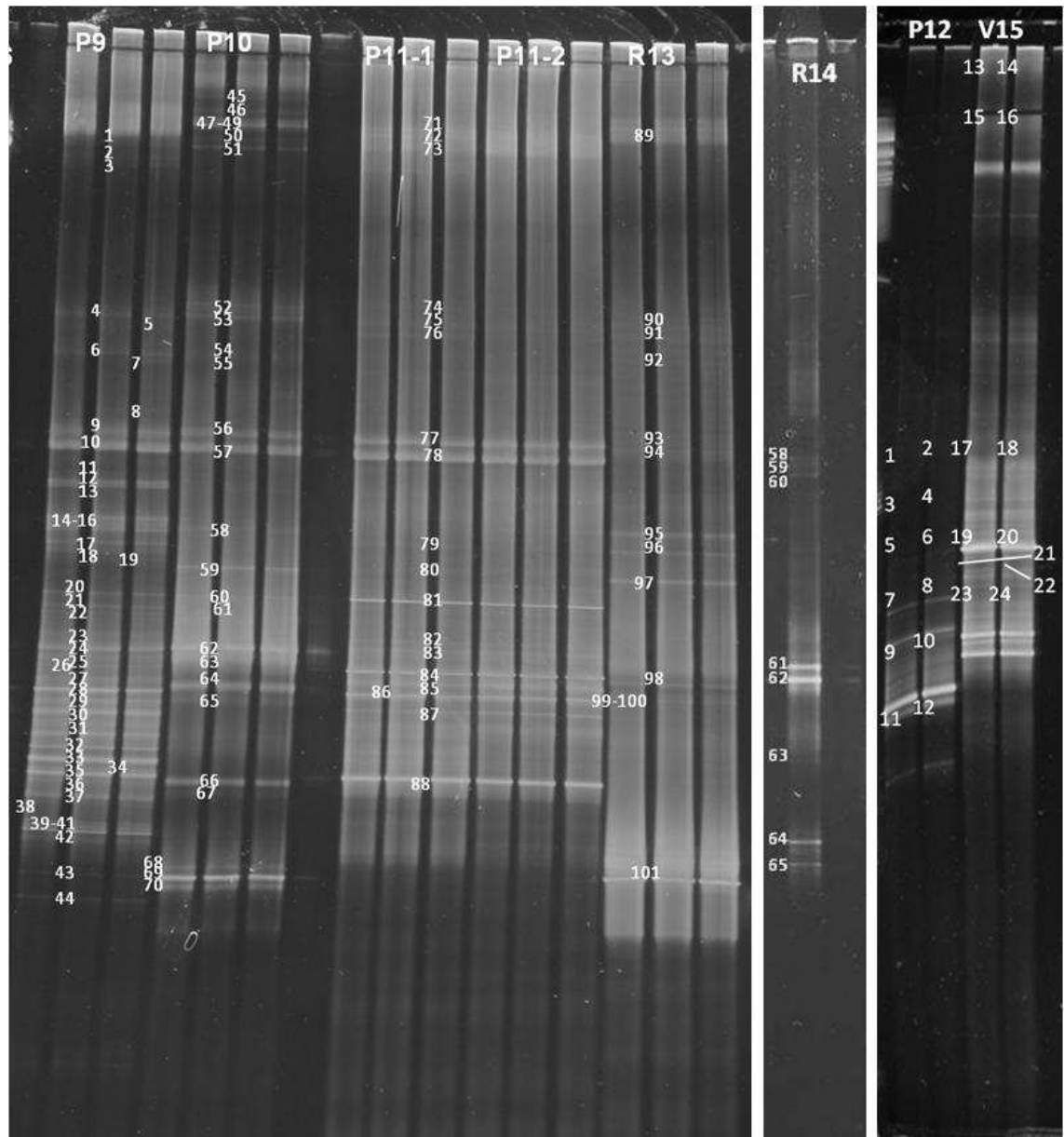


**Kuva 7.20.** Mikroskooppikuvat näytteiden V4 ja P10 DAPI-värjätystä soluista.

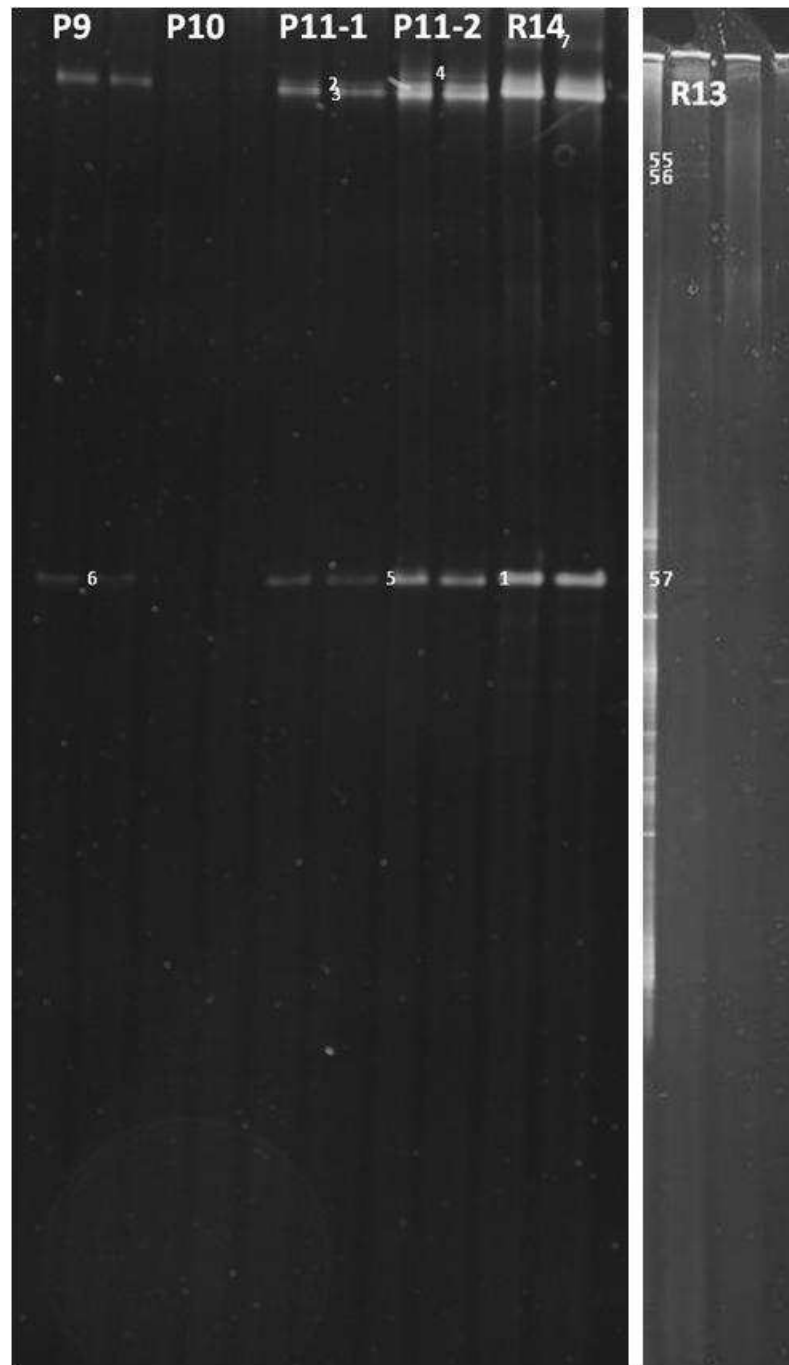
Kokonaissolumäärä näytteissä P9 ja P10 oli hyvin pieni, mutta niissä oli jonkin verran eroa. Pesäkkeitä muodostavat yksiköt vastaavat vain 1.2 – 2.4 % kokonaissolumäärästä (näytteet P9 ja P10). Soluja havaittiin pääasiassa lietepartikkeleiden pinnoilla (näytteet P9 ja P10).

### 7.2.3. Molekulaariset menetelmät

Denaturoiva gradienttigeelielektroforeesikuva näytteiden (taulukko 6.10, s. 51) 16S rRNA-geenifragmenttien erottelusta on esitetty kuvassa 7.21 ja 18S rRNA-geenifragmenttien erottelusta kuvassa 7.22. Kuvissa yksi viiva on erilaisen emäskoostumuksen omaava 16S/18S rRNA-geenifragmentti ja todennäköisesti edustaa yhtä mikrobilajia. Näytteiden P12 ja V15 18S rRNA-geenifragmenttien erottelussa ei havaittu viivoja.

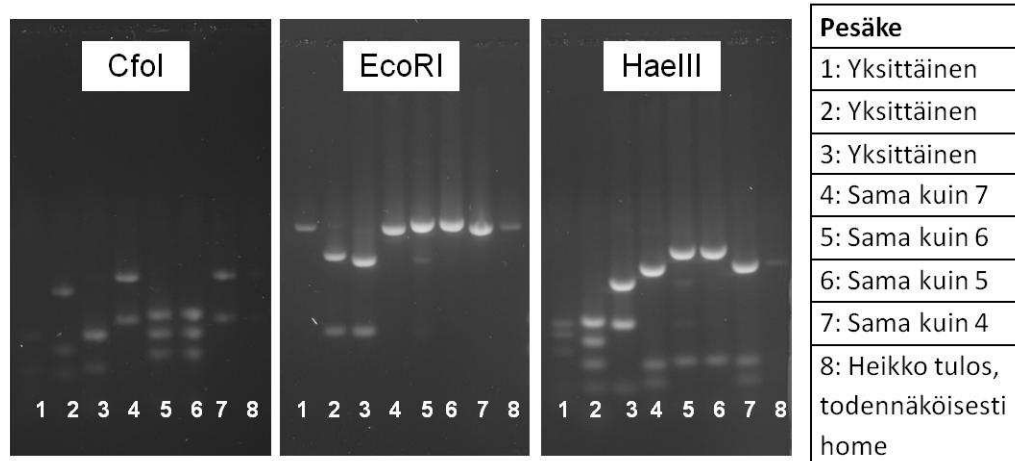


**Kuva 7.21.** Kuva näytteiden P9, P10, P11-1, P11-2 ja R13 (geeli vasemmalla), näytteen R14 (geeli keskellä) sekä näytteiden P12 ja V15 (geeli oikealla) 16S rRNA-geenifragmenttien erottelusta denaturoivalla gradienttielektroforeesilla.



**Kuva 7.22.** Kuva näytteiden P9, P10, P11-1, P11-2 ja R14 (geeli vasemmalla) sekä näytteen R13 (geeli oikealla) 18S rRNA-geenifragmenttien erottelusta denaturoivalla gradienttigelielektroforeesilla.

Agaroosigeeli näytteen P10 standardin IP 385/99 mukaisesti TSA-kasvatusalustalla kasvatetusta kahdeksasta pesäkkeestä PCR-monistettujen 16S rRNA-geenifragmenttien erilaisuuden varmistuksesta restriktioentsyymidigestiolla on esitetty kuvassa 7.23. Näistä todennäköisesti yksilöllisten pesäkkeiden PCR-tuotteet puhdistettiin, sekvensoitiin ja bakteerit identifioitiin.



**Kuva 7.23.** Näytteestä P10 standardin IP 385/99 mukaisesti TSA-kasvatusalustalla kasvatetusta kahdeksasta pesäkkeestä PCR-monistettujen 16S rRNA-geenifragmenttien erilaisuuden varmistus restriktioentsyymidigestiolla (restriktioentsyymit *CfoI*, *EcoRI* ja *HaeIII*).

Näytteiden (taulukko 6.10, s. 51) eroteltujen 16S rRNA-geenifragmenttien sekvenssianalyysit on esitetty taulukossa 7.1 ja eroteltujen 18S rRNA-geenifragmenttien sekvenssianalyysi taulukossa 7.2. Näytteen P10 standardin IP 385/99 TSA-kasvatusalustalla kasvatettujen viiden todennäköisesti yksilöllisen pesäkkeen 16S rRNA-geenifragmenttien sekvenssianalyysi on esitetty taulukossa 7.3. DGGE-viivojen, joiden analyysiä ei ole esitetty edellä mainituissa taulukoissa, eluoidun DNA:n monitus polymeraasiketjureaktiolla ei onnistunut tai sekvenssi oli epäselvä. Mikäli taulukoissa esitetyt samanlaisuusprosentit ovat alle 90 %, ei sukulaisuudesta lähimpään organismiin voida tehdä johtopäätöksiä. Lisäksi tulosten tarkastelussa on huomioitava, että näytteistä eristetyistä DNA:sta monistettiin osa 16S/18S rRNA-geenin sekvenssistä, joten 100% samanlaisuus ei välttämättä tarkoita täydellistä vastaavuutta.



**Taulukko 7.1. Näytteiden eroteltujen 16S rRNA-geenifragmenttien sekvenssianalyysi.**

Näyte /DGGE- viiva	Lähtö organismi MegaBLAST -ohjelmalla	Samanlaisuus (%)	Tunniste numero	Luokitus
<b>P9-1</b>	<i>Rhizobiales</i> bakteeri Nis3	95	AB563785	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
<b>P9-2/3</b>	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	97	CP000781.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter
<b>P9-4/7</b>	<i>Bradyrhizobium canariense</i> LL-6	97	GU306143.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
<b>P9-5</b>	<i>Bradyrhizobium canariense</i> LL-6	98	GU306143.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
<b>P9-6</b>	<i>Afiplia</i> sp. KC-IT-F4	91	FJ711197.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Afiplia
<b>P9-8</b>	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	88	AY055796.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Nitrobacter
<b>P9-9*</b>	<i>Nitrobacter</i> sp. 311	73	AM292300.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Nitrobacter
<b>P9-10</b>	<i>Rhizobiales</i> bakteeri Nis3	92	AB563785.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
<b>P9-11</b>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 656	91	AY904732	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
<b>P9-12</b>	<i>Bradyrhizobium canariense</i> LL-6	98	GU306143	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
<b>P9-13</b>	<i>Bradyrhizobium</i> sp. klooni MWE_N32	95	FJ391499.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
<b>P9-14</b>	Kasvatamaton klooni FW1023-061	97	EF693297.1	Bacteria
<b>P9-15</b>	Kasvatamaton klooni FW1023-061	99.6	EF693297.1	Bacteria
<b>P9-16</b>	Kasvatamaton klooni FW1023-061	96	EF693297.1	Bacteria
<b>P9-18</b>	Kasvatamaton klooni FW1013-040	81	EF692979.1	Bacteria
<b>P9-19</b>	<i>Nitrobacter</i> sp. PBAB17	87	AY508476	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Nitrobacter
<b>P9-20</b>	<i>Phyllobacterium</i> sp. Hue-8	93	EF364393	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae; Phyllobacterium
<b>P9-21</b>	<i>Rhizobium</i> sp. CCB AU 21244	76	AY555768.2	- Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Rhizobium/Agrobacterium gp; Rhizobium
<b>P9-22</b>	<i>Xanthobacter agilis</i> SA35	93	NR_026306	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter
<b>P9-23</b>	<i>Brevundimonas vesicularis</i> RB 2-3-3	94	AI852055.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P9-25</b>	<i>Rhizobiales</i> bakteeri Nis3	87	AB563785.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales
<b>P9-26</b>	<i>Afiplia broomeae</i> kanta G5958	94	U87761.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Afiplia
<b>P9-27</b>	<i>Rhizobiales</i> bakteeri Nis3	85	AB563785.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; Hyphomicrobium
<b>P9-28</b>	<i>Bradyrhizobium canariense</i> LL6	100	GU306143.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
<b>P9-29</b>	<i>Bradyrhizobium canariense</i> LL6	97	GU306143.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
<b>P9-30</b>	<i>Afiplia</i> sp. KC-IT-F4	99.7	FJ711197.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Afiplia
<b>P9-31</b>	<i>Geothrix fermentans</i> H5	89	NR_036779	Acidobacteria; Holophagae; Holophagales; Geothrix
<b>P9-32</b>	<i>Mesorhizobium</i> sp. NH-14	96	AB196496.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae; Mesorhizobium
<b>P9-33</b>	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	99.8	CP000781.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter
<b>P9-34</b>	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	97	CP000781.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter
<b>P9-35*</b>	<i>Ochrobactrum</i> sp. M13	73	GU372412	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum
<b>P9-38</b>	<i>Pseudoxanthobacter</i> sp. DDT-1	86	FJ587218	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Pseudoxanthobacter
<b>P9-40</b>	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	96	CP000781.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter
<b>P9-41*</b>	<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571	70	AP009384	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium
<b>P9-42</b>	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	98	CP000781.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter

**Taulukko 7.1. Näytteiden eroteltujen 16S rRNA-geenifragmenttien sekvenssianalyysi (jatkuu)**

Näyte /DGGE- viiva	Lähtö organismi MegaBLAST -ohjelmalla	Samanlaisuus (%)	Tunniste numero	Luokitus
<b>P9-44</b>	<i>Cellulomonadaceae</i> bakteeri RR24	98	AB174808	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococciaceae; Cellulomonadaceae
<b>P10-45</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. Cil9	95	FR754553.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-46</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. Cil9	96	FR754553.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-47</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. Cil9	90	FR754553.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-48</b>	<i>Rhodospseudomonas</i> sp. P531(4)	81	GU370108	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiales; Rhodospseudomonas.
<b>P10-49*</b>	<i>Brevundimonas</i> H2/98-FUNDUS	77	AJ313427	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-50</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. Cil9	96	FR754553.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-51</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. Cil9	97	FR754553.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-52*</b>	<i>Pseudomonas</i> sp. JVD3A	70	HQ599263	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas
<b>P10-53</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. LMG 11070	94	AJ244648	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-58</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. Cil9	81	FR754553.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-59</b>	<i>Pseudomonas</i> sp. PKG89	87	HQ591436	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas
<b>P10-61</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. Cil9	98	FR754553.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-62</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. Cil9	88	FR754553.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-63*</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> kanta 3854	68	F1665502	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas
<b>P10-64</b>	<i>Ochrobactrum</i> sp. BS30	99,8	HM132104	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum
<b>P10-65</b>	<i>Brevundimonas</i> sp. PVC	89	AM421787	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteriales; Caulobacteraceae; Brevundimonas
<b>P10-66/67</b>	<i>Alipia</i> sp. spzw29	100	GU377117.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiales; Bosea
	<i>Bosea</i> sp. AKB-2008-RN17	100	AM988985.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiales; Bosea
	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85057	100	EU256463.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiales; Bradyrhizobium
<b>P10-68/69/70</b>	<i>Rhodococcus erythropolis</i> kanta Chile 1	100	HQ660426	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacteriaceae; Rhodococcus
<b>P11-1-74</b>	<i>Burkholderia fungorum</i> RHT12	83	GU182117	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-75</b>	<i>Burkholderia fungorum</i> RHT12	88	GU182117	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-76*(1)</b>	<i>Burkholderia fungorum</i> RHT12	82	GU182117	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-79</b>	<i>Burkholderia fungorum</i> RHT12	85	GU182117	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-80</b>	<i>Burkholderia fungorum</i> RHT12	83	GU182117	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-81</b>	<i>Burkholderia</i> sp. AH76	98	HM151959	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-82</b>	<i>Burkholderia</i> sp. N1SM1	92	AM231275	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-83</b>	<i>Burkholderia xenovorans</i> TA1-07106	90	EU723242	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-84</b>	<i>Burkholderia xenovorans</i> B2-5	99	EF467847	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia
<b>P11-1-85</b>	<i>Glucacetobacter liquefaciens</i> BW1	97	F1483515	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Glucacetobacter
<b>P11-1-86</b>	<i>Oligotropha carboxidovorans</i>	99,6	AB099060	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiales; Oligotropha
<b>P11-1-87*</b>	<i>Azorhizobium johannae</i> BR5414	68	AY655487	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Azorhizobium

Taulukko 7.1. Näytteiden eroteltujen 16S rRNA-geenifragmenttien sekvenssianalyysi (jatkuu)

Näyte /DGGE- viiva	Lähin organismi MegaBLAST -ohjelmalla	Samanlaisuus (%)	Tunniste numero	Luokitus
P11-1/88	<i>Azospirillum amazonense</i> SDSA-114/1	97	GU372345	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Azospirillum.
P12-1/2	<i>Paracoccus</i> sp. sw-3	99,7	FJ593906	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Paracoccus
P12-3/4	<i>Paracoccus</i> sp. JLT1284	99,7	EU650196.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Paracoccus
P12-5/6	<i>Paracoccus</i> sp. JLT1284	99,7	EU650196.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Paracoccus
P12-7/8	<i>Paracoccus</i> sp. JLT1284	99,8	EU650196.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Paracoccus
P12-9/10	<i>Paracoccus</i> sp. JLT1284	99,8	EU650196.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Paracoccus
R13-89*	Kasvattamaton bakteeriklони PB_B6	72	EF429652	Bacteria
R13-91	<i>Rhodococcus erythropolis</i> kanta Chile 1	99	HQ660426	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus
R13-92	<i>Rhodococcus erythropolis</i> isolatti M17-3	96	EF690410	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus
R13-93	<i>Rhodococcus erythropolis</i> isolatti M17-3	88	EF690410	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus
R13-94	<i>Rhodococcus erythropolis</i> isolatti M17-3	87	EF690410	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus
R13-96	<i>Pseudomonas</i> sp. SW83	93	HM584787	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas
R13-97	<i>Pseudomonas</i> sp. PKG89	97	HQ591436	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas
R13-98	<i>Ochrobactrum</i> sp. 01xTSA12B_C05	83	HM113643	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum
R13-99*	<i>Pseudomonas</i> sp. JVD3A	78	HQ599263	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas
R13-100*	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	74	AJ576250	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus
R13-101	<i>Rhodococcus erythropolis</i> kanta Chile 1	99,9	HQ660426	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus
R14-58	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DG	99	HM151913	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
R14-59/60	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DG	99,8	HM151913	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
R14-61	<i>Rhodopseudomonas</i> sp. SSRW9-3	99,5	AB299773	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Rhodopseudomonas
R14-62	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DG	100	HM151913	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
R14-63	<i>Bradyrhizobium</i> sp. vgn-1	99,6	AF510585	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium
R14-64	<i>Rhodococcus erythropolis</i> kanta Chile 1	100	HQ660426	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus
R14-65	<i>Rhodococcus</i> sp. RM135	82	DQ903976	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae; Rhodococcus
V15-15/16	<i>Pandoraea norimbergensis</i> CCUG 39188	99,7	AY268174	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Pandoraea
V15-17/18	<i>Pandoraea norimbergensis</i> CCUG 39188	100	AY268174	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Pandoraea
V15-19/20	<i>Rhizobium leguminosarum</i> kanta Y-6	99,8	GU306145	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Rhizobium/Agrobacterium group; Rhizobium
V15-23/24	<i>Flexibacter</i> sp. CF 1	87	AF361187	Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Cytophagaceae; Flexibacter

\* Hakuun käytetty epäjatkuvaa MegaBLASTia

1) Sekvenssin pituus alle 200 nt

Taulukko 7.2. Näytteiden eroteltujen 18S rRNA-geenifragmenttien sekvenssianalyysi

Näyte / DGGE- viiva	Lähin organismi MegaBLAST -ohjelmalla	Samanlaisuus (%)	Tunnistenumero	Luokitus
P9-6	<i>Leptodontidium irregulare</i>	78	AY129281.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota; mitosporic Ascomycota
P11-1-2	<i>Sydowia polyspora</i> AFTOL-ID 1300	87	DQ678005.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina
P11-1-3	<i>Exophiala calicioides</i> JCM9764	94	AB007685.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina
P11-2-4*	<i>Xenobotrytis acaducospora</i>	74	EU541483.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota; mitosporic Ascomycota
P11-2-5	<i>Exophiala calicioides</i> JCM9764	98	AB007685.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina
R13-55	<i>Lecanicillium</i> sp. BTCC-F17	98	AB360358.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina
R13-56	<i>Phyllosticta hamamelidis</i> MUCC0153	86	AB454247.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina
R14-1	<i>Rhinocladia aquaspersa</i>	87	AB185091.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina
R14-7	<i>Ascomycota</i> sp. MVFS2	82	EU887742.1	Sienet; Dikarya; Ascomycota

\* Hakuun käytetty epäjatkuvaa MegaBLASTia

Taulukko 7.3. Näytteen P10 standardin IP 385/99 TSA-kasvatustalustalla kasvatettujen viiden todennäköisesti yksilöllisen pesäkkeen 16S rRNA-geenifragmenttien sekvenssianalyysi

Näyte (pesäke)	Lähin organismi MegaBLAST -ohjelmalla	Samanlaisuus (%)	Tunnistenumero	Luokitus
1	<i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i>	100	AB106864.1	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae; Xanthobacter
2	<i>Cellulomonadaceae</i> bakteeri RR24	99	AB174808.1	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococccineae; Cellulomonadaceae
3	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	100	AM490633	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	100	AF501340	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum
4 ja 5	<i>Pseudomonas</i> sp. BS1(2009)	100	GQ281048.1	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas
	<i>Gordonia</i> sp. TLG 1-10	100	FJ459999.2	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Gordoniaceae; Gordonia

Polttoainenäytteistä (P9 – P12) suurin prokarioottidiversiteetti oli näytteessä P9 (taulukko 7.1). Tämä näyte oli myös silmämääräisesti tarkasteltuna kontaminoitunein (taulukko 6.10, s. 51). Näytteessä P9 yleisimmät bakteerisuvut olivat *Afipia*, *Bradyrhizobium*, *Nitrobacter* ja *Xanthobacter*. *Bradyrhizobium* suvun bakteerit ovat kemoorganotrofeja ja käyttäessään hiilihydraatteja muodostavat solunulkoisia polysakkarideja (Garrity et al. 2005). *Nitrobacter* suvun bakteerit ovat aerobeja, mutta pystyvät anerorespiraatioon nitraatin avulla (Garrity et al. 2005). *Xanthobacter* suvun bakteerit ovat aerobeja, joista suurin osa tuottaa runsaasti limaa (Garrity et al. 2005). Näytteessä P10 yleisimmät bakteerisuvut olivat *Brevundimonas* ja *Pseudomonas*. Näytteessä P11-1 yleisin bakteerisuku oli *Burkholderia*. Näytteessä P12 esiintyi vain *Paracoccus* suvun bakteereita. Näytteistä ei löydetty rihmaisista bakteereita.

Näytteet R13 ja R14 ovat polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa rikastettua biomassaa. Näytteessä R13 (rikastettu biomassa koepullosta, jossa vesifaasina steriili mineraalisuolaliuos) yleisimmät bakteerisuvut olivat *Rhodococcus* ja *Pseudomonas*, joita kumpaakaan ei eristetty näytteestä P9. *Rhodococcus* suvun bakteerit pystyvät hajottamaan monenlaisia orgaanisia yhdisteitä ja poistavat biologisesti rikkiä fossiilisista polttoaineista (McLeod et al. 2006). *Pseudomonas* sp. JVD3A bakteeri on eristetty raakaöljyllä saastuneesta subantarktisesta maaperästä. Näytteessä R14 (rikastettu biomassa koepullosta, jossa vesifaasina steriili MilliQ-vesi) yleisimmät bakteerisuvut olivat *Bradyrhizobium* ja *Rhodococcus*. Polttoaineen 1 säiliön vesinäytteessä V15 yleisin bakteerisuku oli *Pandoraea*.

Näytteistä tunnistetut eukariootit olivat sieniä (taulukko 7.2) ja jokaisesta näytteestä tunnistettiin yksi tai kaksi eri sientä lukuun ottamatta näytteitä P10, P12 ja V15. Suurin osa sienistä oli rihmastollisia kotelosieniä. 15 *Lecanicillium* suvun sieniin (näyte R13) perustuvaa biologista tuholaistorjunta-ainetta on kaupallistettu (de Faria ja Wraight 2007).

Näytteen P10 standardin IP 385/99 TSA-kasvatusalustalla kasvatetuista pesäkkeistä tunnistetuista bakteereista ainoastaan *Cellulomonadaceae* bakteeri RR24 (pesäke 2) eristettiin polttoainenäytteestä P9 (taulukko 7.3). *Ochrobactrum anthropi* (pesäke 3) on eristetty öljyllä saastuneesta ritsosfääristä. *Pseudomonas* sp. BS1(2009) (pesäkkeet 4 ja 5) on todettu tuottavan pinta-aktiivisia aineita. *Gordonia* sp. TLG 1-10 (pesäkkeet 4 ja 5) on eristetty öljyperäisillä hiilivedyillä saastuneesta maasta.

## 8. TULOSTEN TARKASTELU

### 8.1. Mikrobien kasvu ja sen hallinta polttoaineissa

#### 8.1.1. Polttoaineiden soveltuvuus mikrobien ravinnoksi

##### *Kiinteä kasvatusalusta*

Tutkimuksen tarkoituksena oli verrata standardin IP 385/99 mukaista maljakasvatusmenetelmää menetelmään, jossa polttoainetta 1 käytetään hiilenlähteenä kiinteässä kasvatusalustassa. Polttoaine 1 ei absorboitunut kiinteään kasvatusalustaan, joten sitä ei voida käyttää sellaisenaan hiilenlähteenä kiinteässä kasvatusalustassa.

Polttoaineiden biohajoamistutkimuksissa on käytetty pinta-aktiivisena aineena rannolipidejä (Owsianiak et al. 2009) ja polyoksietyleni(20)sorbitaanimonoo-oleaattia (Tween 80<sup>®</sup>) (Chandran ja Das 2010) polttoaineen ja vesiliuoksen emulsion muodostuksessa. Joidenkin bakteerien on todettu käyttävän Tween 80<sup>®</sup>:a hiilen lähteenä (Brar et al. 2005; Li et al. 2001; Fakhreddine et al. 1998). Näistä bakteereista muun muassa *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus brevis* ja *Bacillus licheniformis* on esiintynyt mineraaliöljypohjaisissa polttoaineissa (taulukko 4.1, s. 24). Pinta-aktiivisten aineiden käyttö saattaisi edistää polttoaineen absorboitumista kiinteään kasvatusalustaan, mutta tällöin mikro-organismien käyttämän hiilenlähteen todentaminen vaikeutuisi.

##### *Vesifaasi*

Tutkimuksen tarkoituksena oli rikastaa polttoaineessa 1 esiintyviä mikro-organismeja sekä analysoida polttoaineiden 1 ja 2 pilaantumista. Molemmat polttoaineet soveltuivat mikrobien ravinnoksi, sillä erilaiset polttoaineet tarjoavat hyvän hiilenlähteen erilaisille mikro-organismeille (Yemashova et al. 2007; Van Hamme et al. 2003).

Polttoaineen 1 pilaantumisen seurantatutkimuksessa siirrostetuissa koepulloissa havaittiin biomassankasvua viikon kuluessa, kun vesifaasina oli mineraalisuolaliuos, ja kuuden viikon kuluessa, kun vesifaasina oli MilliQ-vesi. Vastaavasti tutkimusjaksojen kokonaispituudet olivat 2 ja 8 viikkoa. Toisin sanoen mineraalisuolaliuos edistää kontaminoivien mikro-organismien kasvua polttoaineessa 1. Diplomityön kokeellisessa osuudessa mineraalisuolaliuosta käytettiin mikrobien kasvun nopeuttamiseen. Ilman mineraalisuolaliuosta kasvu oli hidasta, joka osoittaa kasvun mineraalirajoitteisuuden. Biomassan kasvu tapahtui pääasiassa faasien rajapinnassa, kuten on todettu tapahtuvan myös polttoainejärjestelmissä (Passman 2003). Käytännössä polttoaineen varastosäiliön vesifaasi ei kuitenkaan vastaa mineraalisuolaliuosta, vaan mikro-organismien tarvitsemia makro- ja mikroravinteita on vesifaasissa saatavilla rajoitetusti. Esimerkiksi fosfori on usein yksi kasvua rajoittavista ravinteista. Puhtaan tai hyvin vähän kontaminoituneen

polttoainesäiliön vesifaasin ominaisuudet ovat lähellä sadevettä. (Robbins ja Levy 2004; Passman 2003)

Vesifaasien pH:n havaittiin laskevan ja liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuuksien kasvavan siirrostetuissa koepulloissa samaan aikaan, kun biomassan kasvua havaittiin. Nämä havainnot liittyvät kiinteästi mikrobien kasvuun. DOC-pitoisuuden kasvu johtuu mikro-organismien metaboliatuotteista ja vesifaasin pH:n lasku hiilivetyjä käyttävien mikrobien tuottamista orgaanisista hapoista (Robbins ja Levy 2004). Haihtuvia rasvahappoja ei kertynyt tutkimusjakson aikana.

Mikroskoopilla tarkasteltuna polttoaineessa 1 esiintyvät rikastetut mikro-organismit vaikuttivat olevan homeita ja hiivoja (vesifaasina mineraalisuolaliuos). Ilmeisesti pH:n lasku tutkimusjakson aikana suosi homeiden kasvua (Madigan ja Martinko 2006).

Polttoaineen 2 pilaantumisen seurantalutkimuksessa siirrostetuissa koepulloissa havaittiin biomassankasvua viikon kuluessa, kun vesifaasina oli mineraalisuolaliuos, ja kolmen viikon kuluessa, kun vesifaasina oli polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi. Vastaavasti tutkimusjaksojen kokonaispituudet olivat 3 ja 8 viikkoa. Mineraalisuolaliuos edistää kontaminoivien mikro-organismien kasvua myös polttoaineessa 2. Koepullost, joissa vesifaasina oli polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi, vastaavat parhaiten todellista ravinnetilannetta polttoaineen varastosäiliössä. Veden määrä on käytännössä huomattavasti pienempi kuin tutkimuksessa käytetyissä koepulloissa (50% kokonaistilavuudesta).

Vesifaasien pH:n ja DOC-pitoisuuden muutokset olivat polttoaineen 2 osalta samankaltaisia kuin edellä, kun vesifaasina oli mineraalisuolaliuos. Koska vesifaaseja ei pusku-roitu, polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistetun veden pH oli tutkimusjakson ajan noin 4. Biomassan kasvu oli hyvin pientä siirrostetuissa koepulloissa, joissa vesifaasina oli polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi. Suurin osa mikro-organismeista esiintyy pH-alueella 5 – 9 (Madigan ja Martinko 2006), joten matala pH on todennäköisin syy rajoittuneeseen biomassan kasvuun. Polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistetun veden DOC-pitoisuudet olivat 10 – 100-kertaisia verrattuna muista käytetyistä vesifaaseista mitattuihin pitoisuuksiin tutkimusjakson aikana. DOC-pitoisuuksissa oli vaihtelua, mutta kertymistä ei havaittu. Haihtuvia rasvahappoja ei kertynyt tutkimusjakson aikana.

### ***Biofilmi***

Biofilmin muodostumista tutkittiin polttoaineen 1 varastosäiliöiden pinnoitemateriaalilla päällystettyjen mikroskoopin objektilasien avulla polttoainetta 1 ja vesifaasia sisältävissä polypropeeniputkissa. Polypropeenin kemiallinen kestävyys on hyvä. Huoneenlämpötilassa polypropeeni turpoaa hieman orgaanisten liuottimien vaikutuksesta. Polypropeenilla on myös pieni veden absorptio. (Koleva 2011) Voidaan arvioida, että muoviputkien materiaali ei vaikuttanut koetulokseen ja faasien ominaisuuksiin. Biofilmin kasvua havaittiin sekä polttoaineen että vesifaasien rajapinnoilla. Passmanin (2003) mukaan suurin osa (> 99 %) polttoainesäiliössä olevasta biomassasta on havaittu esiintyvän biofilmeissä. Eniten biofilmiä muodostuu yleensä polttoaine- ja vesifaasien rajapinnalle,

koska tässä rajapinnassa vettä ja ravinteita on parhaiten saatavilla (Passman 2003). Tämä tukee tutkimuksessa tehtyä havaintoa biofilmin kasvusta.

Polttoainefaasin biofilmimikrobien kokonaismäärät olivat suuremmat kuin vesifaasin kaikkien eri vesifaasien kohdalla. Yemashovan et al. (2007) mukaan mikrobien on havaittu jakaantuvan epätasaisesti polttoaineiden varastoinnissa. Dieselpolttoainesäiliön säiliön syöttö- ja poistoputkien tasolla (aivan vesifaasin yläpuolella) mikrobipitoisuuden havaittiin olevan kymmenkertainen vesifaasiin verrattuna. Polttoainefaasissa säiliön alaosassa havaittu mikrobipitoisuus oli 1000 kertaa pienempi kuin aivan vesifaasin yläpuolella, säiliön keskiosassa enää noin sata solua/ml ja säiliön yläosassa ei mikrobeita havaittu ollenkaan. (Yemashova et al. 2007) Muoviputkien kokonaisnestetilavuus oli pieni (34 ml), joten faasien biofilmimikrobien kokonaismäärät vastaavat dieselpolttoainesäiliön vesifaasissa ja aivan vesifaasin yläpuolella havaittujen mikrobipitoisuuksien suhdetta.

Mineraalisuolaliuosta sisältävien muoviputkien kokonaissolumäärät olivat 100 – 1000 kertaa suuremmat neliösenttimetriä kohden molemmissa faaseissa kuin polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä (näyte V4) sisältävien. Näyte V4 ei ilmeisesti sisällä yhtä paljon mineraaleja mikrobikasvuun kuin käytetty mineraalisuolaliuos. Puskuroitua polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä sisältävien muoviputkien kokonaissolumäärät olivat kuusinkertaisia neliösenttimetriä kohden puskuroimattomiin verrattuna. Puskuroimattomassa vesifaasin pH laski arvoon 4, mutta puskuroidussa pH ei muuttunut. Ilmeisesti pH:n lasku rajoitti biofilmin kasvua. Puskuroimaton polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi vastaa parhaiten todellista polttoaineen varastosäiliön vesifaasin ravinnetilannetta ja puskurikapasiteettia. Veden määrä on todellisuudessa huomattavasti pienempi kuin tutkimuksessa käytetyissä muoviputkissa (50% kokonaistilavuudesta).

Kun pinnoitemateriaaleilla päällystettyjä objektilaseja inkuboitiin pelkästään polttoaineessa 1, biofilmiä ei muodostunut. Mikrobikasvua rajoitti tällöin veden saatavuus (Madigan ja Martinko 2006). Koska vesi on elintärkeä mikro-organismien kasvulle ja elinkykyisyydelle, säännöllinen ja huolellinen vedenpoisto on tärkeä ja ensisijainen toimenpide polttoaineiden mikrobiologisen kontaminaation estossa ja hallinnassa (Yemashova et al. 2007).

### **8.1.2. Lämpötilan vaikutus mikrobikasvuun polttoaineessa**

Lämpötilan vaikutusta mikrobikasvun kinetiikkaan polttoaineessa 1 tutkittiin kolmessa lämpötilassa: 6°C, 27°C ja 37°C. Tutkimuksessa mikro-organismien siirrostukseen käytettiin 0.01% laimennosta polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa rikastetusta biomassasta, joka oli kasvatettu 27°C:ssa. Mikrobikasvun havaittiin olevan nopeinta 27°C lämpötilassa sekä tapahtuvan viiveellä ja hitaammin 37°C lämpötilassa. 6°C lämpötilassa ei havaittu mikrobikasvua 8 viikon tutkimusjakson aikana.

Polttoaineissa kasvavien mikro-organismien on havaittu esiintyvän lämpötila-alueella 4 – 60°C, mutta hiilivetyjä hapettavien mikro-organismien diversiteetin on havaittu olevan suurin lämpötilan ollessa 25 – 30°C (Yemashova et al. 2007; Chung et al.



2000). Tutkimuksessa havaittiin lämpötilan rajoittava vaikutus mikrobikasvuun. 37°C lämpötila oli mikrobien optimilämpötilan yläpuolella, joka hidasti mikrobikasvua. Siirrostetut mikro-organismit olivat selektoituneet 27°C:ssa, joka aiheutti kasvuviiheen 37°C lämpötilassa. 6°C lämpötila oli puolestaan oli selkeästi mikrobien optimilämpötilan alapuolella, jolloin mikrobikasvu ja entsymaattiset reaktiot hidastuivat merkittävästi. Kasvua olisi ehkä havaittu, jos tutkimusjaksoa olisi pidennetty 8 viikosta.

27°C lämpötilassa vesifaasin vertailuna käytettiin mineraalisuolaliuoksen lisäksi polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä (näyte V4) ja MilliQ-vettä. Mikrobikasvu oli nopeinta siirrostetuissa koepulloissa, joissa oli mineraalisuolaliuosta ja toiseksi nopeinta koepullossa, jossa vesifaasina oli näytettä V4. Ei-siirrostetussa koepullossa, jossa vesifaasina oli mineraalisuolaliuosta, havaittiin myös mikrobikasvua, mutta vähemmän kuin siirrostetuissa mineraalisuolaliuosta sisältävissä koepulloissa. Ei-siirrostetussa koepullossa käytettiin steriloimatonta polttoainenäytettä, jossa ilmeisesti oli mikro-organismeja. Niiden mikrobikasvu oli hitaampaa kuin siirrostettujen mikro-organismien, joita oli rikastettu polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa 27°C lämpötilassa. Koepullossa, jossa vesifaasina oli MilliQ-vettä, havaittiin hyvin vähäistä mikrobikasvua. Tämä johtuu vesifaasin mineraalirajoitteisuudesta.

### **8.1.3. Mikrobikasvun hillintä polttoaineessa**

Mikrobikasvua anaerobisissa olosuhteissa polttoaineessa 1 seurattiin 27°C lämpötilassa 8 viikkoa. Mikrobikasvua ei havaittu tutkimusjakson aikana. Hiilivetyjen hajoaminen anaerobisissa olosuhteissa on huomattavasti hitaampaa kuin aerobisissa olosuhteissa. Hiilivetyjen anaerobinen hajoaminen rajoittuu myös rajalliseen määrään yhdisteitä ja on energiataloudellisesti huonompi vaihtoehto aerobiseen hajoamiseen verrattuna. (Atlas ja Bartha 1998; Schwartz ja Leathen 1976). Vaikuttaa siltä, että mikrobikasvua voidaan hillitä merkittävästi polttoainesäiliöissä anaerobisten olosuhteiden avulla. Anaerobisten bakteerien kasvu voi kuitenkin aiheuttaa polttoainejärjestelmissä säiliöiden ja putkien korroosiota sekä myrkyllisen rikkivedyn tuottoa (sulfaattia pelkistävät bakteerit) (Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999).

## **8.2. Mikrobit polttoaineessa**

Mikrobien lukumäärää polttoaineessa 1 tutkittiin standardin IP 385/99 mukaisen maljakasvatusmenetelmän ja mikroskopian avulla. Lisäksi mikrobien diversiteettiä polttoaineessa 1 tutkittiin molekulaaristen menetelmien avulla.

### **8.2.1. Pesäkkeitä muodostavat yksiköt**

Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä oli molemmissa tutkituissa näytteissä hyvin pieni; 15 PMY/ml näytteessä P9 ja 11 PMY/ml näytteessä P10 TSA-kasvualustalla. Saybolt van Duyn BV (Saastamoinen 1996 mukaan) esittämien polttoaineen mikrobi- toisuuksille raja-arvojen mukaan kontaminoituneessa polttoaineessa on yli 10 PMY/ml.

Tämän perusteella polttoainenäytteet voidaan luokitella kontaminoituneiksi. Silmämääräisesti tarkasteltuna näytteet vaikuttivat myös kontaminoituneilta (taulukko 6.7 ja kuva 6.2, s. 48).

Lehtola et al. (2002) raportoivat talousveden kokonaismikrobimäärän vaihtelevan  $1.6 \cdot 10^3$  soluja/ml ja  $3.1 \cdot 10^5$  soluja/ml välillä kemiallisen käsittelyn jälkeen (ennen desinfiointia) yhdeksällä suomalaisella pintavesilaitoksella. Tähän verrattuna polttoainenäytteiden pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä oli pieni.

### 8.2.2. Kokonaissolumäärä mikroskoppoinnin avulla

Kokonaissolumäärä oli molemmissa tutkituissa polttoainenäytteissä hyvin pieni; 1271 solua/ml näytteessä P9 ja 453 solua/ml näytteessä P10. Niissä oli kuitenkin jonkin verran eroa. Silmämääräisesti tarkasteltuna näyte P9 oli kontaminoituneempi kuin näyte P10 (taulukko 6.8, s. 49 ja kuva 6.2, s. 48). Kokonaissolumäärä polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistetussa vedessä (näyte V4; taulukko 6.8, s. 49) oli myös hyvin pieni; 8558 solua/ml. Pesäkkeitä muodostavat yksiköt vastaavat vain 1.2 – 2.4 % kokonaissolumäärästä (näytteet P9 ja P10). Amann et al. (1995) ovat arvioineet, että monien ympäristöjen bakteereista alle prosentti on kasvatettavissa. Polttoainenäytteiden pesäkkeitä muodostavien yksiköiden suhde kokonaissolumäärään vastaa tätä arvioita.

Allsopp et al. (2004) esittämän luokituksen mukaan lievästi kontaminoituneessa vesifaasissa on noin  $10^5$  bakteeria/ml tai  $10^3$  –  $10^4$  hiivaa ja/tai hometta/ml, kun taas erittäin kontaminoituneessa vesifaasissa  $10^6$  –  $10^8$  bakteeria/ml tai  $10^4$  –  $10^6$  hiivaa ja/tai hometta/ml. Puhtaassa polttoaineessa on alle 50 mikro-organismia/ml, mutta vesifaasissa saattaa olla  $10^4$  bakteeria/ml. Tämän perusteella polttoainenäytteet voidaan luokitella lievästi kontaminoituneiksi ja polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi puhtaaksi.

Pintavesilaitoksissa valmistetun talousveden kokonaismikrobimääriin kemiallisen käsittelyn jälkeen ( $1.6 \cdot 10^3$  soluja/ml –  $3.1 \cdot 10^5$  soluja/ml; Lehtola et al. 2002) verrattuna polttoainenäytteiden ja polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistetun veden kokonaismikrobimäärä oli pieni.

### 8.2.3. Molekulaariset menetelmät

Näytteiden prokarioottidiversiteetti oli laaja (taulukko 7.1, s. 74). Näytteistä (taulukko 6.10, s. 51) tunnistetuista prokariooteista on aiemmin esiintynyt mineraaliöljypohjaisissa polttoaineissa ja niiden varastoinnissa (taulukko 4.1, s. 24) *Bradyrhizobium* (näytteet P9, P10 ja R14), *Phyllobacterium* (näyte P9), *Pseudomonas* (näytteet P10 ja R13, pesäkkeet 4 ja 5), *Rhodococcus* (näytteet P10, R13 ja R14), *Burkholderia* (näyte P11-1) ja *Pandoraea* (näyte V15) suvun bakteereita sekä *Ochrobactrum anthropi* (pesäke 3). Aiemmin esiintyneiden bakteerien määrä on pieni verrattuna näytteiden koko prokarioottidiversiteettiin.

Näytteiden eukarioottidiversiteetti oli pieni (taulukko 7.2, s. 77). Näytteistä (taulukko 6.10, s. 51) tunnistetuista eukariooteista on aiemmin esiintynyt mineraaliöljypohjaisissa polttoaineissa ja niiden varastoinnissa (taulukko 4.1, s. 24) *Rhinocladia* suvun

sieniä (näyte R14). Uusien tunnistettujen mikro-organismien löytyminen näytteistä aiempaan tutkimukseen verrattuna ei ole yllättävää, sillä erilaiset polttoaineet tarjoavat hyvän hiilenlähteen erilaisille mikro-organismeille (Yemashova et al. 2007).

Näytteet R13 ja R14 ovat polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa rikastettua biomassaa. Näyte R13 on koepullosta, jossa vesifaasina oli steriili mineraalisuolaliuos ja näyte R14 koepullosta, jossa vesifaasina oli steriili MilliQ-vesi. Hiilenlähteenä oli näyte P2 (ei-steriili) ja mikro-organismien siirrostukseen käytettiin 1 til-% 20× näytekonsentraattia näytteestä P1 (alkuperä sama kuin näytteellä P9). Rikastetun biomassan mikro-organismit näytteissä R13 ja R14 ovat peräisin näytteistä P1 ja P2. Voidaan olettaa, että mikrobidiversiteetti koepulloissa on kokeen alussa ollut vähintään yhtä suuri kuin näytteessä P9. Mikro-organismien selektiivinen rikastuminen polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimusjakson aikana voidaan havaita selkeästi näytteiden R13 ja R14 mikrobidiversiteetin suppeudesta näytteeseen P9 verrattuna (taulukko 7.1, s. 74).

Näytteestä P10 standardin IP 385/99 mukaisen maljakasvatusmenetelmän avulla eristettiin viisi todennäköisesti yksilöllistä pesäkettä (taulukko 7.3, s. 77). Suoraan näytteestä P10 analysoitu mikrobiversiteetti (taulukko 7.1, s. 74) oli huomattavasti monimuotoisempi kuin maljakasvatusmenetelmällä saatu. Tämä havainnollistaa selkeästi, miten selektiivisesti maljakasvatusmenetelmä valikoi maljalla kasvavat mikro-organismit ja antaa siten puutteellisen kuvan mikrobiston todellisesta monimuotoisuudesta.

Polttoainenäytteessä P9 esiintyneet *Bradyrhizobium* suvun bakteerit muodostavat solunulkoisia polysakkarideja käyttäessään hiilihydraatteja ja *Xanthobacter* suvun bakteereista suurin osa tuottaa runsaasti limaa (Garrity et al. 2005). Suurin osa näytteistä tunnistetuista eukariooteista oli rihmastollisia kotelosieniä. Rihmasienet ja solun ulkoisia polysakkarideja muodostavat bakteerit voivat aiheuttaa tukkeutumisoongelmia putkissa, venttiileissä, suodattimissa ja vedenpoistopisteissä sekä mitta-antureiden vääriä arvoja biofilmin muodostumisen seurauksena (Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999). Myös limaa tuottavien bakteerien voidaan olettaa voivan aiheuttaa samanlaisia ongelmia polttoainejärjestelmissä. Näytteistä R13 ja R14 (polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa rikastettu biomassa) esiintyneet *Rhodococcus* suvun bakteerit pystyvät hajottamaan monenlaisia orgaanisia yhdisteitä ja poistavat biologisesti rikkiä fossiilisista polttoaineista (McLeod et al. 2006). Nämä bakteerit voivat vaikuttaa polttoaineen laatuun. Pesäkkeet 4 ja 5 tunnistettiin bakteeriksi *Pseudomonas* sp. BS1(2009), jonka on todettu tuottavan pinta-aktiivisia aineita. Pinta-aktiivisten aineiden tuotto voi aiheuttaa öljyn/veden emulgoitumista, solujen irtoamista öljyfaasiin ja lauhduttimen/vedenerottimen toimintahäiriöitä (Robbins ja Levy 2004; Gaylarde et al. 1999). Rihmaisia bakteereita ja polttoainesäiliöiden korroosioon eniten vaikuttavia anaerobisia sulfaattia pelkistäviä bakteereita (tuottavat myrkyllistä rikkivetykaasua) ei näytteissä havaittu.

## 9. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän diplomityön kokeellisessa osuudessa tutkittiin kahta polttoainetta. Työn tarkoituksena oli tutkia polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi, mikrobien määrää ja diversiteettiä eri polttoaineissa, polttoaineiden pilaantumisen etenemistä sekä mikrobikasvun hillitsemistä ja estoa.

Polttoaineiden soveltuvuutta mikrobien ravinnoksi tutkittiin kolmella eri mikrobien kasvutavalla: kiinteällä kasvatusalustalla, liukoissa vesifaasissa sekä biofilmissä. Kiinteällä kasvatusalustalla oli tarkoituksena verrata standardin IP 385/99 mukaista maljakasvatusmenetelmää menetelmään, jossa polttoainetta 1 käytetään hiilenlähteenä kiinteässä kasvatusalustassa. Polttoaine 1 ei absorboitunut kiinteään kasvatusalustaan, joten sitä ei voida käyttää sellaisenaan hiilenlähteenä kiinteässä kasvatusalustassa. Pinta-aktiivisten aineiden käyttö saattaisi edistää polttoaineen absorboitumista kiinteään kasvatusalustaan, mutta tällöin mikro-organismien käyttämän hiilenlähteen todentaminen vaikeutuisi.

Liukoissa vesifaasissa oli tarkoitus rikastaa polttoaineessa 1 esiintyviä mikroorganismeja sekä analysoida polttoaineiden 1 ja 2 pilaantumista ravistelupullokokein, joissa oli 50 til-% polttoainenäytettä ja 50 til-% vesifaasia. Molemmat tutkitut polttoaineet soveltuivat mikrobien ravinnoksi. Mikrobien kasvun nopeuttamiseen käytetyn mineraalisuolaliuoksen havaittiin edistävän kontaminoivien mikro-organismien kasvua polttoaineissa. Ilman mineraalisuolaliuosta kasvu oli hidasta, joka osoittaa mikrobikasvun mineraalirajoitteisuuden. Vesifaasien pH:n havaittiin laskevan ja liukoisen orgaanisen hiilen pitoisuuden kasvavan koepulloissa, joihin oli siirrostettu polttoaineesta 1 eristettyjä mikro-organismeja, samaan aikaan, kun biomassan kasvua havaittiin. Haihtuvia rasvahappoja ei kertynyt tutkimusjakson aikana. Matala pH (noin 4 koko tutkimusjakson ajan) rajoitti mikrobikasvua koepulloissa, joissa vesifaasina oli puskuroimatonta polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä. Tämä vesifaasi vastaa parhaiten todellista polttoaineen varastosäiliön vesifaasin ravinnetilannetta.

Biofilmin muodostumista tutkittiin polttoaineen 1 varastosäiliöiden pinnoitemateriaalilla päällystettyjen mikroskoopin objektilasien avulla polttoainetta 1 ja vesifaasia sisältävissä polypropeeniputkissa. Biofilmin kasvua havaittiin sekä polttoaineen että vesifaasien rajapinnoilla. Polttoaineen varastosäiliössä suurin osa (> 99 %) olevasta biomassasta on havaittu esiintyvän biofilmeissä ja eniten biofilmiä muodostuu yleensä polttoaine- ja vesifaasien rajapinnalle. Polttoaineefaasin biofilmmikrobien kokonaismäärät olivat suuremmat kuin vesifaasin kaikkien eri vesifaasien kohdalla. Muoviputkien kokonaisnestetilavuus oli pieni, joten faasien biofilmmikrobien kokonaismäärät vastaavat dieselipolttoaineen varastosäiliön vesifaasissa ja aivan vesifaasin yläpuolella havaittujen

mikrobipitoisuuksien suhdetta. Mineraalisuolaliuosta sisältävien muoviputkien kokonaissolumäärät olivat 100 – 1000 kertaa suuremmat neliösenttimetriä kohden molemmissa faaseissa kuin polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä sisältävien johtuen ilmeisesti poistetun veden mineraalirajoitteisuudesta. Lisäksi pH:n lasku arvoon 4 rajoitti mikrobikasvua muoviputkessa, joissa vesifaasina oli puskuroimatonta polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä. Biofilmiä ei muodostunut, kun pinnoitemateriaaleilla päällystettyjä objektilaseja inkuboitiin pelkästään polttoaineessa 1. Mikrobikasvua rajoitti tällöin veden saatavuus. Koska vesi on elintärkeä mikro-organismien kasvulle ja elinkykyisyydelle, säännöllistä ja huolellista vedenpoistoa pidetään tärkeänä ja ensisijaisena toimenpiteenä polttoaineiden mikrobiologisen kontaminaation estossa ja hallinnassa.

Lämpötilan vaikutusta mikrobikasvun kinetiikkaan polttoaineessa 1 tutkittiin kolmessa lämpötilassa: 6°C, 27°C ja 37°C ravistelupullokokein. Tutkimuksessa havaittiin lämpötilan rajoittava vaikutus mikrobikasvuun. Mikrobikasvun havaittiin olevan nopeinta 27°C lämpötilassa sekä tapahtuvan viiveellä ja hitaammin 37°C lämpötilassa. 6°C lämpötilassa ei havaittu mikrobikasvua 8 viikon tutkimusjakson aikana. 27°C lämpötilassa vesifaasin vertailuna käytettiin mineraalisuolaliuoksen lisäksi polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettua vettä ja MilliQ-vettä. Mikrobien kasvun nopeuttamiseen käytetyn mineraalisuolaliuoksen havaittiin edistävän kontaminoivien mikro-organismien kasvua myös tässä tutkimuksessa muihin kahteen käytettyyn vesifaasiin verrattuna.

Mikrobikasvun hillintää tutkittiin anaerobisissa olosuhteissa polttoaineessa 1 27°C lämpötilassa 8 viikon ajan. Mikrobikasvua ei havaittu tutkimusjakson aikana. Vaikuttaa siltä, että mikrobikasvua voidaan hillitä merkittävästi polttoainesäiliöissä anaerobisten olosuhteiden avulla. Anaerobisten bakteerien kasvu voi kuitenkin aiheuttaa polttoainejärjestelmissä säiliöiden ja putkien korroosiota sekä myrkyllisen rikkivedyn tuottoa (sulfaattia pelkistävät bakteerit).

Mikrobikasvua polttoaineessa voidaan hillitä veden saatavuudella, matalalla pH:lla ja lämpötilalla sekä anaerobisilla olosuhteilla. Veden saatavuuden rajoitus polttoaineen varastosäiliössä on toteutettavissa säännöllisellä ja huolellisella vedenpoistolla. Polttoaineen varastosäiliön vesifaasin pH:n säädöllä voidaan saavuttaa mikrobikasvua rajoittava matala pH, mutta todennäköisesti on helpompaa ja toteuttamiskelpoisempaa rajoittaa veden määrää varastosäiliössä. Polttoaineen varastosäiliöiden lämpötilasäätely on käytännössä hankalaa ja kallista, sillä niiden tilavuus on yleensä suuri ja varastosäiliöön pumpattavan uuden polttoaineen lämpötila korkea. Anaerobisten olosuhteiden teknisen toteutuksen mahdollisuutta ja taloudellisuutta tulisi tutkia täydessä mittakaavassa todellisessa polttoaineen varastointiympäristössä. Esimerkiksi varastoitavan polttoaineen (lentopetroli 300 ppm, biodiesel 11 paino-% ja mineraaliöljypohjainen diesel ei liuenutta happea) happipitoisuus vaikuttaa anaerobisten olosuhteiden ylläpitoon. Anaerobisten olosuhteiden toteutuksen lisäksi tulee anaerobisten bakteerien kasvua hallita polttoaineen varastosäiliössä muunlaisin toimenpitein, esimerkiksi säännöllisellä ja huolellisella vedenpoistolla, niiden mahdollisesti aiheuttamien haittojen estämiseksi.

Mikrobien lukumäärää polttoaineessa 1 tutkittiin standardin IP 385/99 mukaisen maljakasvatusmenetelmän ja mikroskopoinnin avulla. Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä oli molemmissa tutkituissa näytteissä hyvin pieni (11 – 15 PMY/ml tryptofaani-soija-agar -kasvualustalla). Polttoainenäytteet voidaan kuitenkin luokitella kontaminoituneiksi ( $> 10$  PMY/ml; Saybolt van Duyn BV, Saastamoinen 1996 mukaan). Myös mikroskopoinnin avulla määritetty kokonaissolumäärä oli hyvin pieni molemmissa tutkituissa polttoainenäytteissä (453 – 1271 solua/ml) ja polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistetussa vedessä (8558 solua/ml). Polttoainenäytteet voidaan luokitella lievästi kontaminoituneiksi (puhdas  $< 50$  mikro-organismia/ml) ja polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistettu vesi puhtaaksi ( $< 10^4$  bakteeria/ml) (Allsopp et al. 2004).

Polttoainenäytteistä määritetyt pesäkkeitä muodostavat yksiköt vastaavat vain 1.2 – 2.4 % kokonaissolumäärästä. Tämä suhde vastaa arvioita kasvatettavien bakteerien määrästä. Pintavesilaitoksissa valmistetun talousveden kokonaismikrobimääriin kemiallisen käsittelyn jälkeen ( $1.6 \cdot 10^3$  soluja/ml –  $3.1 \cdot 10^5$  soluja/ml; Lehtola et al. 2002) verrattuna polttoainenäytteiden ja polttoaineen 1 varastosäiliöstä poistetun veden kokonaismikrobimäärä oli pieni.

Mikrobien diversiteettiä polttoaineessa 1 tutkittiin molekulaaristen menetelmien avulla. Näytteiden prokarioottidiversiteetti oli laaja, mutta näytteistä tunnistetuista prokariooteista vain muutamia on aiemmin esiintynyt mineraaliöljypohjaisissa polttoaineissa ja niiden varastoinnissa. Näytteiden eukarioottidiversiteetti oli pieni ja tunnistetut eukariootit olivat sieniä. Uusien tunnistettujen mikro-organismien löytyminen näytteistä aiempaan tutkimukseen verrattuna ei ole yllättävää, sillä erilaiset polttoaineet tarjoavat hyvän hiilenlähteen erilaisille mikro-organismeille. Näytteissä esiintyneet rihmasienet sekä solun ulkoisia polysakkarideja ja limaa muodostavat bakteerit saattavat aiheuttaa tukkeutumiso ongelmia polttoainejärjestelmissä sekä mitta-antureiden vääriä arvoja biofilmin muodostumisen seurauksena. Lisäksi jotkin näytteissä esiintyneet bakteerit voivat vaikuttaa polttoaineen laatuun poistamalla rikkiä tai tuottamalla pinta-aktiivisia aineita..

Polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimisessa rikastetun biomassan mikrobidiversiteetti oli suppea verrattuna alkuperäiseen polttoainenäytteeseen. Tämä osoittaa selvästi mikro-organismien selektiivisen rikastumisen polttoaineen 1 pilaantumisen tutkimusjakson aikana. Polttoaineesta 1 standardin IP 385/99 mukaisen maljakasvatusmenetelmän avulla eristettiin viisi todennäköisesti erilaista pesäkettä. Suoraan polttoainenäytteestä analysoitu mikrobidiversiteetti oli huomattavasti monimuotoisempi. Tämä havainnollistaa selkeästi, miten selektiivisesti maljakasvatusmenetelmä valikoi maljalla kasvavat mikro-organismit ja antaa siten puutteellisen kuvan mikrobiston todellisesta monimuotoisuudesta.

## LÄHTEET

Allsopp, D., Seal, K. ja Gaylarde, C. 2004. Introduction to biodeterioration. 2. painos. Iso-Britannia, Cambridge University Press. 237 s.

Amann, R.L., Ludwig, W. ja Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 56, 1, s. 143-169.

Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. ja Stahl, D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 6, s. 1919-1925.

Atlas, R.M. ja Bartha, R. 1998. Microbial ecology: Fundamentals and applications. 4. painos. Menlo Park (CA), Yhdysvallat, Benjamin/Cummings Sciency Publishing. 694 s.

Auvinen, H., Nevatalo, L., Kaksonen, A. ja Puhakka, J. 2009. Low temperature (9°C) AMD treatment in a sulfidogenic bioreactor dominated by mesophilic *Desulfomicrobium* species. *Biotechnology and Bioengineering* 104, 4, s. 740-751.

Bakanauskus, S. 1958. Bacterial activity in JP-4 fuel. WADC Technical Report 58-32. Wright-Patterson Air Force Base (OH), Yhdysvallat, Wright Air Development Center.

Balster, L.M., Chelgren, S.K., Strobel, E.M., Vangsness, M.D. ja Bowen, L.L. 2006. Characterization of the bio-burden in United States aviation fuel: A comparison of FTA paper and other methods for obtaining genetic material from aviation fuel microbes. Preprints - American Chemical Society, Division of Petroleum Chemistry 51, 3&4, 3 s.

Bento, F.M. ja Gaylarde, C.C. 2001. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 47, 2, s. 107-112.

Blanchard, G.C. ja Goucher, C.R. 1965. Metabolic products formed by hydrocarbon oxidizing microorganisms. Technical Report. Falls Church (VA), Yhdysvallat, Melpar Inc. s. 2-25.

Boychenko, S., Shkilnuk, I. ja Turchak, V. 2008. The problems of biopollution with jet fuels and the way of achieving solution. *Transport* 23, 3, s. 253-257.

Brar, S.K., Verma, M., Barnabe, S., Tyagi, R.D., Valero, J.R. ja Surampalli, R. 2005. Impact of Tween 80 during *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater sludges. *Process Biochemistry* 40, 8, s. 2695-2705.

Campbell, M.K. ja Farrell, S.O. 2005. Biochemistry. 5. painos. Belmont (CA), Yhdysvallat, Thomson Brooks/Cole. 689 s.

Chandran, P. ja Das, N. 2010. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon Asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. International Journal of Engineering Science and Technology 2, 12, s. 6942-6953.

Chung, Y.C., Chen, H.C., Shyu, Y.T. ja Hua, J. 2000. Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. Fuel 79, 12, s. 1525-1532.

Dworkin, M., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. ja Stackebrandt, E. (toim.). 2006. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3. painos. New York (NY), Yhdysvallat, Springer Science+Business Media, LCC. 7000 s.

D 4012-81. 2002 Standard test method for adenosine triphosphate (ATP) content of microorganisms in water. West Conshohocken (PA), Yhdysvallat, ASTM International. 3 s.

D 4412-84. 2002. Standard test methods for sulfate-reducing bacteria in water and water-formed deposits. West Conshohocken (PA), Yhdysvallat, ASTM International. 3 s.

Demirbas, A. 2005. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. Progress in Energy and Combustion Science 31, 5-6, s. 466-487.

Denaro, T.R., Chelgren, S.K., Lang, J.N., Strobel, E.M., Balster, L.M.T., Vangsness, M.D. 2005. DNA isolation of microbial contaminants in aviation turbine fuel via traditional polymerase chain reaction (PCR) and direct PCR - Preliminary results. Technical Report AFRL-PR-WR-TR-2006-2049. Air Force Research Laboratory, Yhdysvallat.

Dunn, R.O. 2008. Effect of temperature on the oil stability index (OSI) of biodiesel. Energy Fuels 22, 1, s. 657-662.

Ellis, D. Mycology Online [WWW]. University of Adelaide, Australia. [viitattu 24.5.2011]. Saatavissa: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>.

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2003/30/EY, annettu 8.5.2003, liikenteen biopolttoaineiden ja muiden uusiutuvien polttoaineiden käytön edistämisestä. [viitattu 28.4.2011]. Saatavissa: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:123:0042:0046:FI:PDF>.



Euzéby, J.P. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 47, 2, s. 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [viitattu 31.3.2011]. Saatavissa: <http://www.bacterio.net>)

Fakhreddine, L., Kademi, A., Aït-Abdelkader, N. ja Baratti, J.C. 1998. Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strains. Biotechnology Letters 20, 9, s. 879-883.

de Faria, M.R. ja Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43, 3, s. 237-256.

Finefrock, V.H. ja London, S.A. 1968. Microbial contamination of USAF JP-4 fuels. Technical Report AFAPL-TR-68-01. Wright-Patterson Air Force Base (OH), Yhdysvallat, Air Force Aero Propulsion Laboratory.

Fritsche, W. ja Hofrichter, M. 2005. Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms. Teoksessa: Jördening, H.-J. ja Winter, J. (toim.) Environmental Biotechnology: Concepts and Applications. Saksa, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. s. 203-228.

Freeman, W.M., Walker, S.J. ja Vrana, K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. BioTechniques 26, 1, s. 112-125.

Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T. (toim.) 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two: The *Proteobacteria*. 2. painos. New York (NY), Yhdysvallat, Springer-Verlag. 2816 s.

Gaylarde, C.C., Bento, F.M. ja Kelley, J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. Revista de Microbiologia 30, 1, s. 1-10.

Gilbride, K.A., Lee, D.-Y. ja Beaudette, L.A. 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. Journal of Microbiological methods 66, 1, s. 1-20.

Glick, B.R. ja Pasternak, J.J. 2003. Molecular biotechnology – principles and applications of recombinant DNA. 3. painos. Washington (DC), Yhdysvallat, ASM Press. 760 s.

Graboski, M.S. ja McCormick, R.L. 1998. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. Progress in Energy and Combustion Science 24, 2, s. 125-164.

Griffiths, B.S., Ritz, K. ja Wheatley, R.E. 1997. Relationship between functional diversity and genetic diversity in complex microbial communities. Teoksessa: Insam, H. ja Rangger, A. (toim.) Microbial communities: Functional versus structural approaches. Springer Verlag, Saksa. s. 1-9.

Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.M., Garret, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G. ja Sayler, G.S. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. Environmental Science & Technology 37, 2, s. 343-351.

Hartmans, S., Smits, J.P., Van Der Werf, M.J., Vokering, F. ja De Bont, J.A.M. 1989. Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene-degrading *Xanthobacter* strain 124X. Applied and Environmental Microbiology 55, 11, s. 2850-2855.

Henry, S., Baudion, E., López-Gutiérrez, J.C., Martin-Laurent, F., Brauman, A. ja Philippot, L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. Journal of Microbiological Methods 59, 3, s. 327-335.

Holt, J.G. (toim.) 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9. painos. Baltimore (MD), Yhdysvallat, Williams & Wilkins. 816 s.

Hristova, K.R., Lutenegger, C.M. ja Scow, K.M. 2001. Detection and quantification of methyl *tert*-butyl ether-degrading strain PM1 by real-time TaqMan PCR. Applied and Environmental Microbiology 67, 11, s. 5154-5160.

Hästbacka, K. (toim.) 1992. Neste: öljystä muoveihin. Neste, Espoo. 244 s.

IP 385/99. 1999. Determination of the viable microbial content of fuels and fuel components boiling below 390°C – filtration and culture method. London, UK, Institute of Petroleum. 7 s.

IP 472/02. 2002. Determination of fungal fragment content of fuels boiling below 390°C. London, UK, Institute of Petroleum. 3 s.

Itah, A.Y., Brooks, A.A., Ogar, B.O. ja Okure, A.B. 2009. Biodegradation of international Jet A-1 aviation fuel by microorganisms isolated from aircraft tank and joint hydrant storage systems. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 83, 3, s. 318-327.

Juhasz, A.L. ja Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation 45, 1-2, s. 57-88.

Kaksonen, A. Molecular approaches for microbial community analysis [HTML tutorial]. BioMinE project, contract no 500329. [viitattu 19.2.2009]. Saatavissa: <http://www.campus.skelleftea.se/biomine/molecular/index.htm>

Klofutar, B. ja Golob, J. 2007. Microorganisms in diesel and in biodiesel fuels. *Acta chimica slovenica* 54, s. 744-748.

Kolb, S., Knief, C., Stubner, S. ja Conrad, R. 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5, s. 2423-2429.

Koleva, M. (suom. Nykänen, S.). 2011. Polypropyleenit (PP) [WWW-dokumentti]. [viitattu 24.3.2011]. Saatavissa: [http://www.valuatlas.fi/tietomat/docs/plastics\\_PP\\_FI.pdf](http://www.valuatlas.fi/tietomat/docs/plastics_PP_FI.pdf).

Korenblum, E., Sebastián, G.V., Paiva, M.M., Coutinho, C.M.L.M., Magalhães, F.C.M., Peyton, B.M. ja Seldin, L. 2008. Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 1, s. 97-103.

Koskinen, P.E.P., Kaksonen, A.H. ja Puhakka, J.A. 2007. The relationship between instability of H<sub>2</sub> production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 4, s. 742-758.

Kurtzman, C.P ja Fell, J.W. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 4. painos. Amsterdam, Alankomaat, Elsevier Science B.V. 1055 s.

Laitinen, R. ja Toivonen, J. 1991. *Yleinen ja epäorgaaninen kemia*. 6. painos. Hämeenlinna, Karisto Oy. 339 s.

Lane, D.J. 1991. 16S/23A rRNA sequencing. Teoksessa: Stackebrandt, E. ja Goodfellow, M. (toim.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. Yhdysvallat, Wiley Publishing. s. 115-175.

Lee, S.-Y., Bollinger, J., Bezdicek, D. ja Ogram, A. 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 10, s. 3787-3793.

Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Vartiainen, T. ja Martikainen, P.J.. 2002. Changes in content of microbially available phosphorus, assimilable organic carbon and microbial growth potential during drinking water treatment processes. *Water Research* 36, 15, s. 3681-3690.

Leung, D.Y.C., Koo, B.C.P. ja Guo, Y. 2006. Degradation of biodiesel under different storage conditions. *Bioresource Technology* 97, 2, s. 250-256.

Li, C.-Y., Cheng, C.-Y. ja Chen, T.-L. 2001. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology* 29, 4-5, s. 258-263.

Lopes, P.T.C. ja Gaylarde, C. 1996. Use of immunofluorescence to detect the fungus *Hormoconis resinae* in aviation kerosene. *International Biodeterioration & Biodegradation* 37, 1-2, s. 37-40.

Madigan, M.T. ja Martinko, J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11. painos. Upper Saddle River (NJ), Yhdysvallat, Pearson Prentice Hall. 992 s.

Malkki, L. 2006. Rypsiöljyn metyyliesterin paikallinen valmistus ja käyttö. Pro gradu. Jyväskylä. Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos. [viitattu 16.2.2009]. Saatavissa: [http://thesis.jyu.fi/06/URN\\_NBN\\_fi\\_jyu-2006612.pdf](http://thesis.jyu.fi/06/URN_NBN_fi_jyu-2006612.pdf).

Maul, B., Völker, U., Riethdorf, S., Engelmann, S. ja Hecker, M. 1995.  $\sigma$ B-dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics* 248, 1, s. 114-120.

McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W.L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A.L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R.D., Yang, G., Stott, J.M., Schein, J., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A.S., Marra, M.A., Jones, S.J.M., Holt, R., Brinkman, F.S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J.E., Mohn, W.W. ja Eltis, L.D. 2006. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 42, s. 15582-15587.

Metcalf & Eddy, Inc. 1991. Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse. 3. painos. Singapore, McGraw-Hill Book Inc. 1334 s.

Mills, D.K., Fitzgerald, K., Litchfield, C.D. ja Gillevet, P.M. 2003. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. *Journal of Microbiological methods* 54, 1, s. 57-74.

Miyoshi, M. 1895. Die durchbohrung von membranen durch pilzfaden. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 28, s. 269-289.

Morgan, P. ja Watkinson, R.J. 1994. Biodegradation of components of petroleum. Teoksessa: Ratledge, C. (toim.) Biochemistry of microbial degradation. Alankomaat, Kluwer Academic Publishers. s. 1-31.

Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A. ja Wawer C. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. Teoksessa: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. ja De Bruijn F. (toim.) Molecular microbial ecology manual. Alankomaat, Kluwer Academic Publishers. s. 1-23.

Muyzer, G., De Waal, E.C. ja Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59, 3, s. 695-700.

Neste Oil Oyj. 2009. Neste Oil Oyj:n verkkosivut [WWW]. [viitattu 10.2.2009]. Saatavissa: <http://www.neste.fi>.

Neste Oil Oyj. 2005. Biodiesel, luentokalvot 20.10.2005 [WWW]. Kurssi Ene-39.4006 New Energy Production Processes, Teknillinen korkeakoulu, [viitattu 23.3.2009]. Saatavissa: <http://www.termo.hut.fi/Ene-39/4006/biodiesel1.ppt>.

Nowaza, M., Hu, H.-Y., Fujie, K., Tanaka, H. ja Urano, K. 1998. Quantitative detection of *Enterobacter cloacae* strain HO- in bioreactor for chromate wastewater treatment using polymerase chain reaction (PCR). Water Research 32, 11, s. 3472-3476.

Owsianiak, M., Chrzanowski, L., Szulc, A., Staniewski, J., Olszanowski, A., Olejnik-Schmidt, A.K. ja Heipieper, H.J. 2009. Biodegradation of diesel-biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. Bioresource Technology 100, 3, s. 1497-1500.

Passman, F.J. (toim.) 2003. Fuel and Fuel System Microbiology - Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control: (MNL 47). Mayfield (PA), Yhdysvallat, ASTM International. 47 s.

Rajasenkar, A., Anandkumar, B., Maruthamuthu, S., Ting, Y.-P. ja Rahman, P.K.S.M. 2010. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. Applied Microbiology and Biotechnology 85, 4, s. 1175-1188.

Ratledge, C. 1994. Biodegradation of oils, fats and fatty acids. Teoksessa: Ratledge, C. (toim.) Biochemistry of microbial degradation. Alankomaat, Kluwer Academic Publishers. s. 89-141.

Rauch, M.E., Graef, H.W., Rozenzhak, S.M., Jones, S.E., Blackmann, C.A., Kruger, R.L., Naik, R.R. ja Stone, M.O. 2006. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33, 1, s. 29-36.

Robbins, J.A. ja Levy, R. 2004. A review of the microbiological degradation of fuel. Teoksessa: Paulus, W. (toim.) *Directory of Microbicides for the Protection of Materials – A Handbook*. Alankomaat, Springer. s. 177-201.

Rodríguez-Rodríguez, C.E., Rodríguez-Cavallini, E. ja Blanco, R. 2009. Bacterial contamination of automotive fuels in a tropical region: the case of Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 57, 3, s. 489-504.

Saastamoinen, T. 1996. Mikrobit keskiraskaissa polttoaineissa. Pro gradu. Helsinki. Helsingin yliopisto, Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, Mikrobiologian osasto. 119 s.

Salkinoja-Salonen, M. (toim.) 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä, Gummerus Kirjapaino Oy. 760 s.

Sawayama, S., Tsukuhara, K. ja Yagishita, T. 2006. Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. *Bioresource Technology* 97, 1, s. 69-76.

Schleicher, T., Werkmeister, R., Russ, W. ja Mayer-Pittroff, R. 2009. Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures. *Bioresource Technology* 100, 2, s. 724-730.

Schwartz, R.D. ja Leathen, W.W. 1976. Petroleum microbiology. Teoksessa: Miller, B.M. ja Litsky, W. (toim.) *Industrial microbiology*. Yhdysvallat, McGraw-Hill Inc. s. 384-411.

SFS-EN 14214. 2004. Moottoripolttonesteet. Rasvahappometyyliesterit dieselmoottoreille. Vaatimukset ja koestusmenetelmät. Helsinki, Suomen standardoimisliitto. 17 s.

SFS-EN 1484. 1997. Vesianalyysi. Ohjeita orgaanisen hiilen kokonaismäärän (TOC) ja liuenneen orgaanisen hiilen määrän (DOC) määrittämiseen. Helsinki, Suomen standardoimisliitto. 15 s.

SFS 3044. 1980. Veden, lietteen ja sedimentin metallipitoisuudet. Määrittäminen atomiabsorptiospektrofotometrisesti liekkimenetelmällä. Yleisiä periaatteita ja ohjeita. Helsinki, Suomen standardoimisliitto. 8 s.

SFS 3047. 1980. Veden, lietteen ja sedimentin metallipitoisuudet. Määrittäminen atomiabsorptiospektrofotometrisesti liekkimenetelmällä. Erityisohjeita kadmiumille, koboltille, kuparille, lyijylle, nikkelille, raudalle ja sinkille. Helsinki, Suomen standardoimisliitto. 6 s.

SFS-EN 590. 2004. Moottoripolttonesteet. Dieselpolttoaine. Vaatimukset ja testimenetelmät. Helsinki, Suomen standardoimisliitto. 24 s.

So, C.M. ja Young, L.Y. 1999. Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 12, s. 5532-5540.

Sogin, M.L. ja Gunderson, J.H. 1987. Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. Evolutionary implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503, 1, s.125-139.

Soini, J., Falschlehner, C., Mayer, C., Böhm, D., Weinel, S., Panula, J., Vasala, A. ja Neubauer, P. 2005. Transient increase of ATP as a response to temperature up-shift in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 4, 9, s. 1-8.

Stade, S. ja Siitonen, J. 2006. Nesteen biodieselprosessi, seminaariesitys 24.4.2006 [WWW]. Kurssi Ke 3330000 Kemiantekniikan prosessit, Lappeenranta teknillinen yliopisto. [viitattu 23.3.2009]. Saatavissa: <http://www2.lut.fi/kete/teke/teke/kklemola/2006-NExBTL.pdf>.

Stubner, S. 2004. Quantification of gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 57, 2, s. 219-230.

Suzuki, M.T., Taylor, L.T. ja DeLong, E.F. 2000. Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 11, s. 4605-4614.

Teknos Oy. 2010. Teknos Oy:n verkkosivut [WWW]. [viitattu 29.12.2010]. Saatavissa: <http://www.teknos.fi>.

Van Hamme, J.D., Singh, A. ja Ward, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 4, s. 503-549.

Wang, J., Ma, T., Zhao, L., Li, G., Liang, F. ja Liu, R. 2008. PCR–DGGE method for analyzing the bacterial community in a high temperature petroleum reservoir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 9, s. 1981-1987.

Watanabe, K., Yamamoto, S., Hino, S. ja Harayama, S. 1998. Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. Applied and Environmental Microbiology 64, 4, s. 1203-1209.

Yemashova, N.A., Murygina, V.P., Zhukov, D.V., Zakharyantz, A.A., Gladchenko, M.A., Appanna, V. ja Kalyuzhnyi, S.V. 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 6, 4, s. 315-337.

Young, L.Y. ja Phelps, C.D. 2005. Metabolic biomarkers for monitoring *in situ* anaerobic hydrocarbon degradation. Environmental Health Perspectives 113, 1, s. 62-67.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. ja Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7, 1-2, s. 203-214.